

UNIVERSITE DE CLERMONT-FERRAND

FACULTE DE PHARMACIE

(U.E.R. de Pharmacie)

Année 1971

N° 20

THÈSE
pour le
DOCTORAT EN PHARMACIE
(Diplôme d'Université)
par

Patrick MARTIN

né le 10 Septembre 1945 à Chamalières - 63

Présentée et soutenue publiquement en Avril 1971.

CONTRIBUTION A L'ETUDE ENZYMOPHARMACOLOGIQUE DE
QUELQUES ACIDES SPIROLACTONE CARBOXYLIQUES.

Président : M. BASTIDE, Professeur,
Membres du Jury : M. TRONCHE, Professeur,
M. COUQUELET, Maître de Conférences,
M. BOYER, Maître de Conférences Délégué.

*Clermont-Reproduction, 64 avenue J. Noellet - AUBIERE
(1971)*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNIVERSITE DE CLERMONT-FERRAND

FACULTE DE PHARMACIE

(U.E.R. de Pharmacie)

Année 1971

N°

THÈSE

pour le

DOCTORAT EN PHARMACIE

(Diplôme d'Université)

par

Patrick MARTIN

né le 10 Septembre 1945 à Chamalières - 63

Présentée et soutenue publiquement en Avril 1971.

CONTRIBUTION A L'ETUDE ENZYMOPHARMACOLOGIQUE DE
QUELQUES ACIDES SPIROLACTONE CARBOXYLIQUES.

Président : M. BASTIDE, Professeur,

Membres du Jury : M. TRONCHE, Professeur,
M. COUQUELET, Maître de Conférences,
M. BOYER, Maître de Conférences Délégué.

*Clermont-Reproduction, 64 avenue J. Noellet - AUBIERE
(1971)*



UNIVERSITE
DE
CLERMONT

FACULTE DE PHARMACIE

(U.E.R. DE PHARMACIE)

Doyen : M. COULET
Vice-Doyen ; Mme GAILLARD

Professeurs Honoraires : Mme BLANQUET - M. VAURS.

I - Professeurs Titulaires.

M. BASTIDE	Chimie Biologique et Pharmacodynamie
M. BERGER	Chimie Analytique
M. DAUPHIN	Chimie Pharmaceutique et Toxicologie
M. FEBVRE	Pharmacie Galénique
Mme GAILLARD	Physique Pharmaceutique
M. POURRAT	Matière Médicale
M. TRONCHE	Pharmacie Chimique

II - Professeurs sans Chaire.

Mle CHATONNIER	Chimie Minérale et Minéralogie
Mme POURRAT	Matière Médicale

III - Maîtres de Conférences Agrégés.

M. ANDRAUD	Toxicologie
M. COUQUELET	Pharmacie Chimique
Mme PETIT	Chimie Analytique

IV - DELEGUES DANS LES FONCTIONS DE MAITRES DE CONFERENCES

M. AIACHE	Pharmacie Galénique
M. BOYER	Chimie Biologique
M. GUILLOT	Botanique

Attaché Principal : M. BERTHON

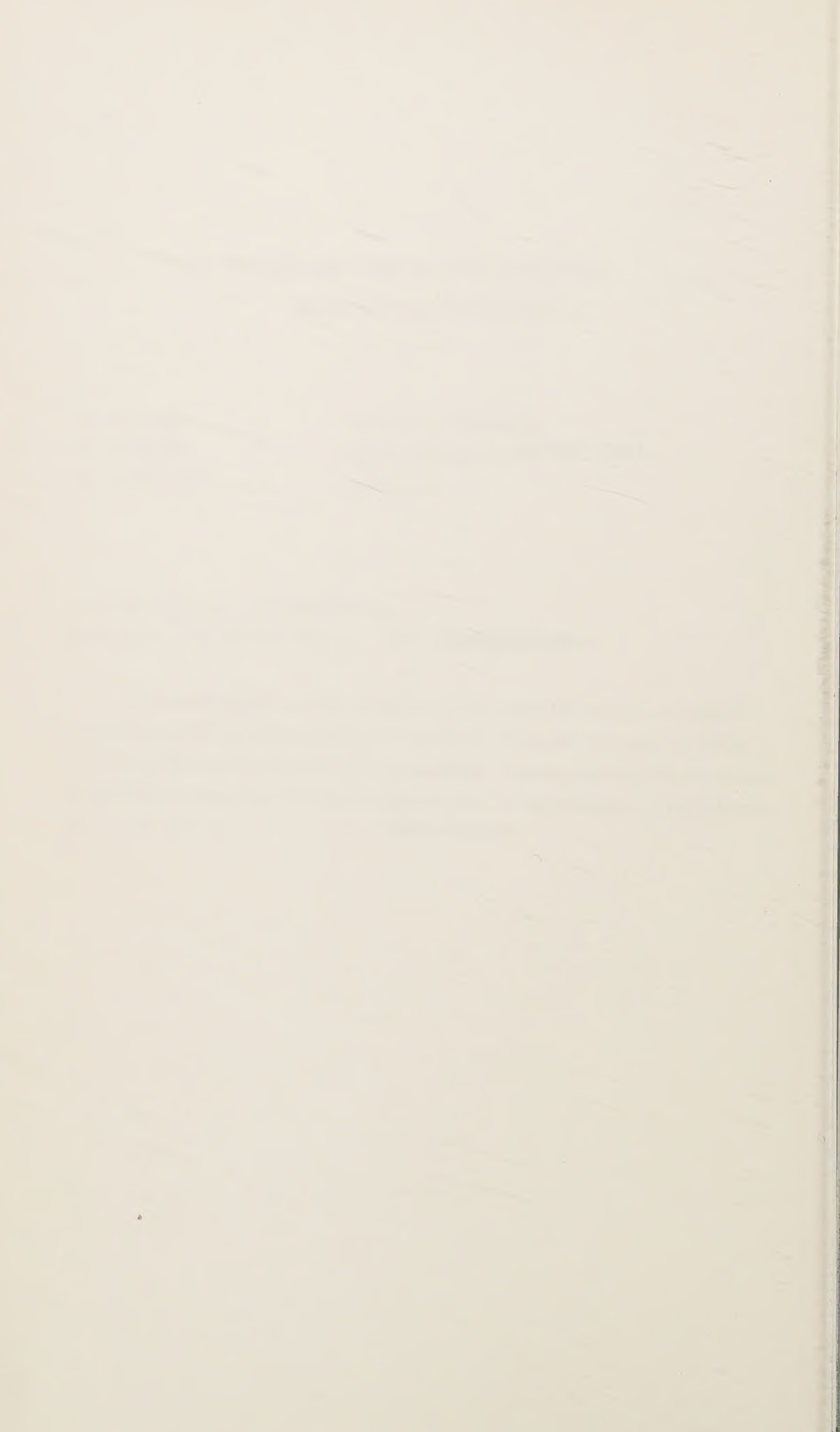
Conservateur de la Bibliothèque : M. ARCHIMBAUD

La faculté décide que les opinions émises dans les travaux et mémoires présentés à l'occasion d'une soutenance de Thèse de Doctorat en Médecine ou en Pharmacie doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner ni approbation, ni improbation (Délibération du 6 juin 1956).

A MA FEMME

A MA FAMILLE

A MES AMIS.



AVANT - PROPOS

Ce travail a pu être réalisé grâce à une étroite collaboration technique entre le Laboratoire de Chimie Biologique et Pharmacodynamie de Monsieur le Professeur BASTIDE et le Laboratoire de Pharmacie Chimique de Monsieur le Professeur TRONCHE. Que tous les enseignants et chercheurs des deux équipes qui nous ont apporté leur concours dans la réalisation de ce travail veuillent bien accepter nos plus vifs remerciements.

Monsieur le Professeur BASTIDE nous a fait l'honneur de nous accueillir dans son Laboratoire. Il nous a confié le sujet de cette thèse et nous a sans cesse orienté dans nos recherches. Sa bienveillance à notre égard a contribué à nous faire apprécier ses grandes qualités humaines et scientifiques. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre fidèle attachement et l'assurance de notre respectueuse gratitude.

Monsieur le Professeur TRONCHE a partagé avec Monsieur le Professeur BASTIDE la direction de cette thèse. Il nous a réservé dans son service l'accueil le plus chaleureux. Nous tenons à le remercier pour ses conseils diligents et sa magistrale compétence. Qu'il nous permette de lui exprimer notre sincère attachement.

Monsieur COUQUELET, Maître de Conférences Agrégé, nous a fait l'honneur de juger cette thèse. Nous le prions de croire à notre profonde gratitude.

Monsieur BOYER, Maître de Conférences délégué, nous permet de disposer des composés dont il avait précédemment réalisé la synthèse afin d'en poursuivre l'étude. Nous n'oublierons jamais l'aide qu'il nous a apportée dans la réalisation de ce travail ni la bienveillance dont il fit toujours preuve à notre égard. Qu'il nous soit permis de lui réaffirmer, pour l'amitié qu'il nous a d'emblée témoignée, notre fidèle attachement et notre très sincère reconnaissance.

Nous associons ici, dans une même pensée respectueuse, tous nos Maîtres de la Faculté de Pharmacie de Clermont-Ferrand. L'excellent enseignement qu'ils nous ont prodigué tout au long de nos études restera le meilleur guide au cours de notre vie professionnelle.

CONTRIBUTION A L'ETUDE ENZYMOPHARMACOLOGIQUE DE
QUELQUES ACIDES SPIROLACTONE CARBOXYLIQUES.

INTRODUCTION

Parmi les substances naturelles ou de synthèse, il est des groupements chimiques qui confèrent à la molécule qui les renferme une unité d'activité pharmacologique remarquable. C'est le cas en particulier des uréides, des pyrazolés, des para amino benzoates. Il en est d'autres, au contraire, pour lesquels les relations entre la structure et l'activité sont beaucoup moins évidentes : ainsi le noyau de la phénothiazine se retrouve-t-il dans des substances antihistaminiques, anti-parkinsoniennes, neuroplégiques ou anti-inflammatoires. C'est dans ce dernier groupe qu'il faut ranger les composés lactoniques dont les activités pharmacodynamiques sont nombreuses et variées.

Dans notre étude bibliographique, après un rappel des aspects chimiques de la fonction lactone essentiellement orienté vers les acides spirolactone carboxyliques, nous essaierons d'étudier les relations entre la fonction lactone et les activités enzymatiques. Nous donnerons enfin un aperçu de la diversité des activités pharmacodynamiques de ces substances.

Nos recherches personnelles ont été orientées par des travaux précédents, réalisés en commun par le laboratoire de Pharmacie Chimique et le laboratoire de Chimie Biologique et Pharmacodynamie. Ces travaux avaient permis de mettre en évidence l'influence sur diverses activités enzymatiques de deux types de composés olidiques : les buténolides 1 - 4 et les acides spirolactone carboxyliques. Les essais pharmacologiques avaient été dans l'ensemble beaucoup moins

probants mais limités à une seule molécule du groupe des spirolactones.

C'est la raison pour laquelle nous avons choisi d'étudier de façon plus détaillée l'activité de divers composés appartenant à cette série, tant au point de vue enzymologique, que pharmacologique.

RECHERCHES BIBLIOGRAPHIQUES

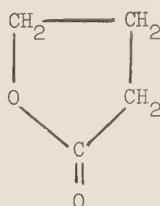


CHAPITRE I

RAPPEL SUR LA CHIMIE DES COMPOSES OLIDIQUES.

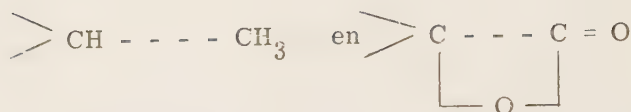
Un olide est un corps cyclique, de fonction neutre, résultant d'une estérification entre une fonction acide et une fonction alcool appartenant à la même molécule.

Le premier olide obtenu fut préparé en 1873 par SAYTZEFF et considéré alors comme le dialdéhyde succinique. Il s'agissait en fait du butanolide ou butyrolactone :

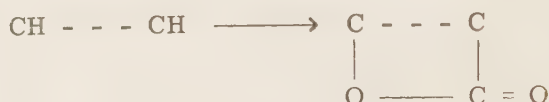


Ce terme de lactone créé en 1844 par PELOUZE (180) est considéré aujourd'hui comme impropre. Déjà en 1892 le Congrès de Genève prescrivait de désigner les lactones en ajoutant le suffixe olide au nom de l'hydrocarbure fondamental correspondant, la position de l'oxygène étant indiquée soit par la numérotation habituelle, soit par les lettres grecques α , β , γ ...

Cette désignation est reprise par les règles de nomenclature les plus récentes (190) qui semblent cependant réserver le terme olide pour désigner la transformation de :



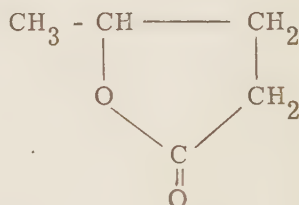
et le terme carbolactone pour une cyclisation au cours de laquelle un atome de carbone supplémentaire est incorporé :



Les cycles olidiques qui prennent naissance le plus facilement sont les composés à cinq maillons. Les acides-alcools pour lesquels les deux fonctions sont l'une par rapport à l'autre en position γ ou 1-4 fournissent très aisément un olide dont le cycle possède une stabilité maximum :



Hydroxy-4-pentanoïque



Méthyl-4 butanolide-4

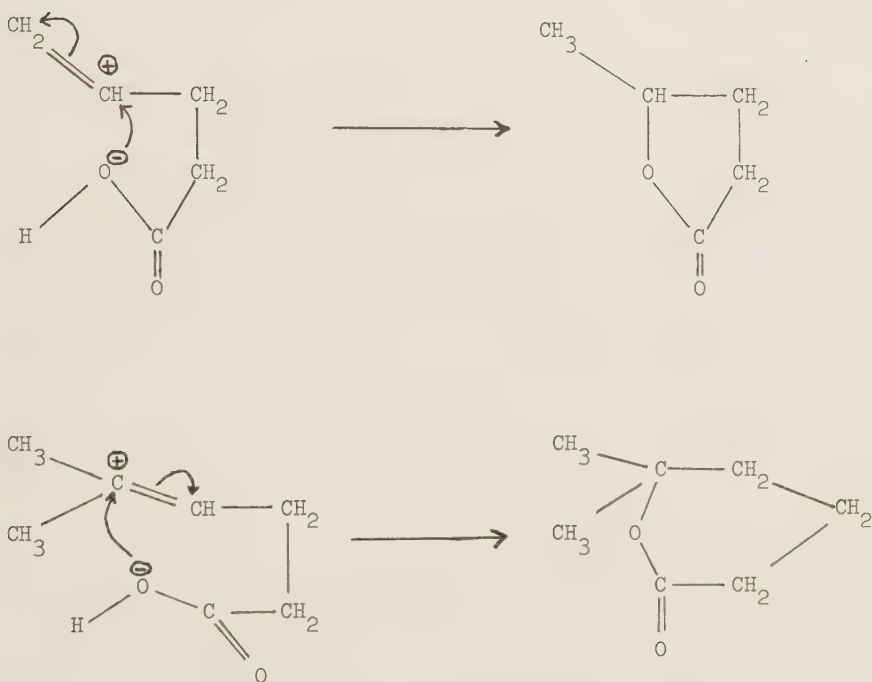
PROCEDES GENERAUX D'OBTENTION.

Cette question a fait l'objet de très nombreux travaux en particulier au laboratoire de Pharmacie Chimique de la Faculté (224) (63) (64). D'autre part, une étude générale très complète a été publiée par RAO (189) Aussi nous limiterons-nous à rappeler brièvement les principales méthodes utilisées pour les γ et δ lactones.

Les olides 1-4 et 1-5 peuvent être facilement obtenus à partir des Acides-alcools correspondants. La réaction réversible à froid devient totale à chaud (177) dans le cas des γ lactones alors que l'équilibre reste fortement orienté du côté de l'hydroxy-acide dans le cas des olides 1-5.

De même les acides halogénés sont transformés en milieu aqueux en γ olides avec d'excellents rendements (169) tandis que la lactonisation directe des acides δ halogénés donne des résultats médiocres.

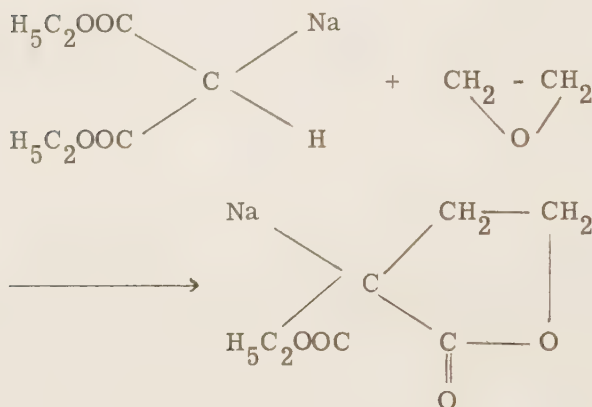
L'acide sulfurique permet de transformer les acides γ éthyléniques en γ olides à froid ou à chaud (162). Lorsque ces acides sont substitués en δ on obtient des δ lactones à température ordinaire :



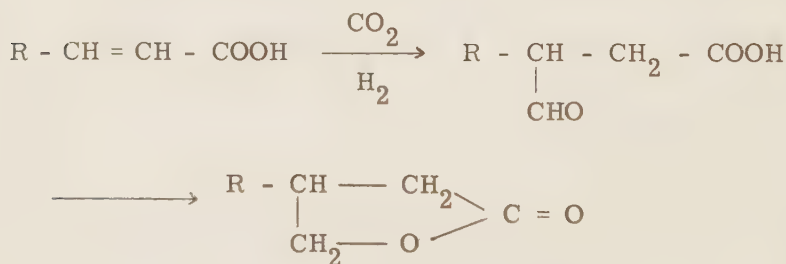
La réduction des diéthers, dichlorures et anhydrides de diacides est une technique surtout intéressante pour les γ olides.

D'autres méthodes en augmentant la condensation en atomes de carbone permettent de créer assez facilement

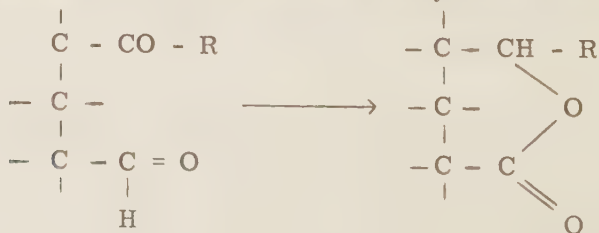
des cycles olidiques pentagonaux. C'est le cas de la synthèse malonique qui fait appel à l'action d'un oxyde d'éthylène sur le malonate d'éthyle sodé (195).



C'est également le cas de l'hydroxy-formylation des acides $\alpha - \beta$ insaturés :



Enfin pour synthétiser des δ olides, on peut faire appel à l'oxydo-réduction intra-moléculaire des dialdéhydes et cétoaldéhydes 1-5 sous l'action de l'éthylate de sodium.

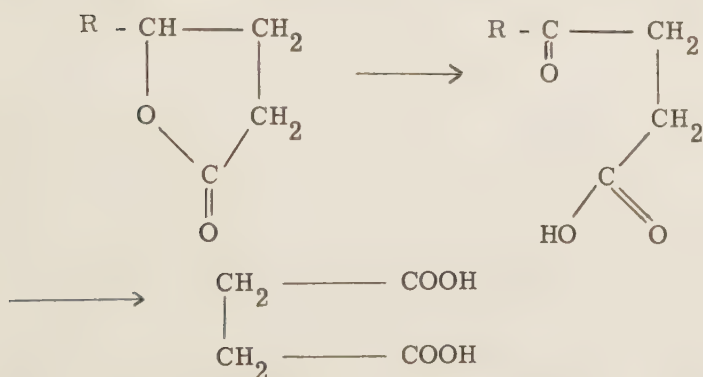


PROPRIETES.

Les γ olides sont hydrolysés lentement par l'eau à température ordinaire et donnent naissance à l'acide alcool correspondant. Cette réaction est favorisée par un milieu alcalin. Il semble que la présence de substituants sur le carbone γ stabilise de façon très nette le cycle lactonique (162).

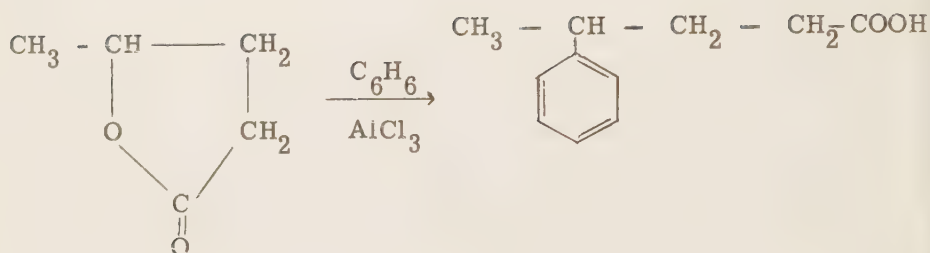
En dehors de l'hydrolyse alcaline, de nombreux agents chimiques sont susceptibles de provoquer l'ouverture de l'anneau olidique (106) :

- les agents d'halogénéation comme le pentachlorure et le pentabromure de phosphore transforment les olides en chlorures d'acides chlorés (ou en bromures d'acides bromés).
- les oxydants comme l'acide chromique transforment les γ lactones en acide succinique avec formation intermédiaire d'un acide γ cétonique que l'on peut isoler :

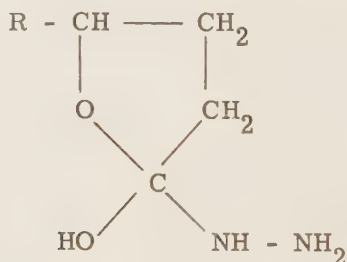


Les réducteurs permettent d'obtenir les acides saturés correspondants.

Le benzène en présence de chlorure d'aluminium anhydre se condense au niveau du carbone γ .

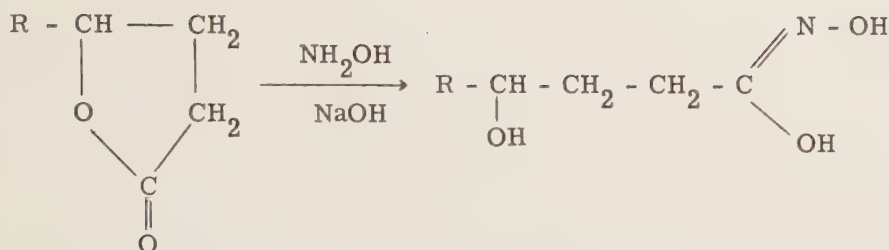


Les réactions sans ouverture du cycle olidique sont beaucoup moins nombreuses (106). Parmi elles nous citerons la condensation avec les aldéhydes, la duplication en présence d'éthylate de sodium et la fixation d'hydrazine au niveau du carbonyle olidique qui donne naissance à des hydrazines lactones de formule générale :



Ces composés bien cristallisés peuvent servir à la caractérisation et à l'identification des olides dans les mélanges complexes et permettent même leur dosage.

D'autres réactifs sont couramment utilisés pour l'analyse des composés lactoniques. Ainsi l'hydroxylamine en milieu alcalin donne naissance à un acide hydroxamique qui peut être révélé par les ions ferriques avec production d'une coloration violette.



Cette réaction peut être également rendue quantitative et permet des dosages colorimétriques par évaluation au spectrophotomètre au voisinage de 535 m μ (182). Notons que certains auteurs (89) utilisent cette technique pour identifier les lactones en chromatographie sur papier ou sur couche mince.

Enfin parmi les autres méthodes d'analyses qualitative ou quantitative on peut citer la titrimétrie (193) (228) la spectrographie infra-rouge et la spectroscopie de masse (89).

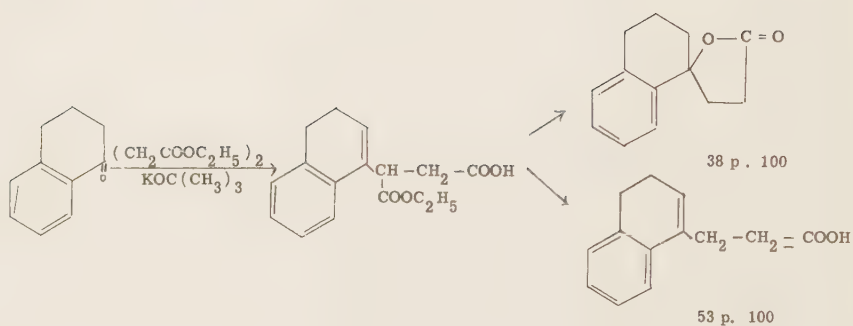
CHAPITRE II

VOIES D'ACCES AUX SPIROLACTONES ET AUX ACIDES LACTONE-CARBOXYLIQUES.

Les spirolactones ont suscité ces dernières années un grand nombre de recherches, essentiellement en série stéroïde. Par contre, les acides lactone carboxyliques ont beaucoup moins attiré l'attention des chercheurs. Nous limiterons volontairement l'étude des techniques permettant d'accéder à ces composés, pour étudier plus en détail les modes d'obtention des acides spirolactone carboxyliques dont nous avons effectué l'étude enzymologique et pharmacologique.

I - LES SPIROLACTONES.

Une des méthodes les plus couramment utilisées pour accéder à ces molécules est la réaction de STOBBE qui permet également l'obtention d'acides spirolactone carboxyliques et sur laquelle nous reviendrons. Cette technique qui fait appel à la condensation de diesters succiniques sur des cétones cycliques a été utilisée en particulier par JOHNSON (137) (134) (135) qui prépare ainsi une spirolactone dérivée de la Tétralone (136) :

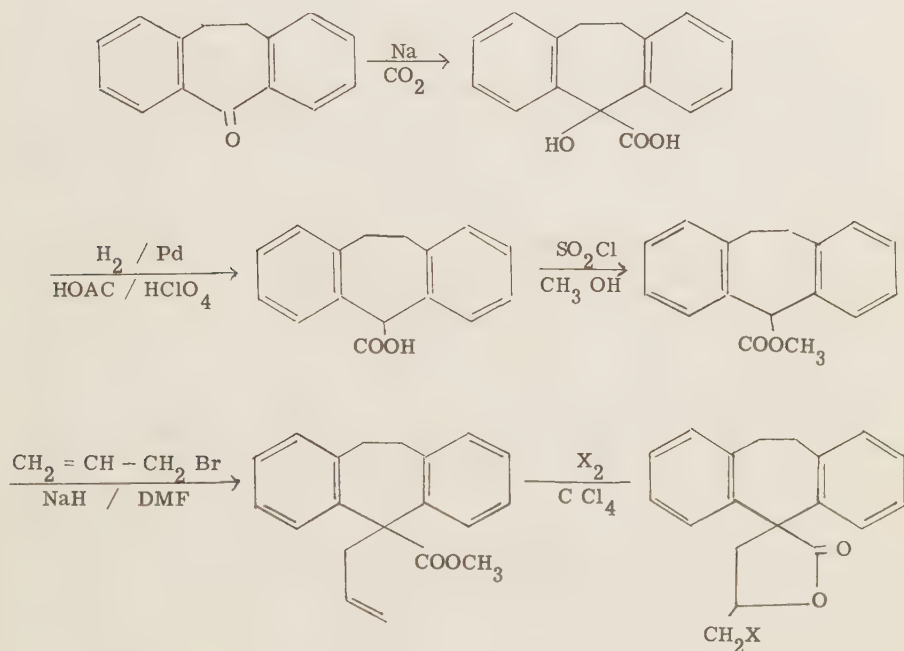


D'autres auteurs utilisent comme matières premières le para-hydroxybenzoate de β bromoéthyl et obtiennent des dérivés de la cyclo-hexadiénone (187) :



Des spirolactones dérivées de la dibenzocycloheptadénone à propriétés antidépressives ont été récemment préparées aux Etats-Unis (232).

Le schéma réactionnel permettant d'accéder à ces composés est le suivant :



Par contre Mac DONALD (164 bis) prépare des dérivés de la N-méthyl pipéridine qui manifestent un effet dépresseur important sur le système nerveux central.

Enfin en série stéroïde de nombreuses méthodes ont été utilisées pour synthétiser des substances inhibitrices de l'Aldostérone, le plus souvent dérivées de l'Aldactone (+). C'est le cas de lactones spirostéroïdes à propriétés diurétiques préparées aux Etats-Unis -(44). D'autres composés

appartenant à la même série ont manifesté des propriétés cardiotoniques et anti-inflammatoires. Les méthodes permettant d'accéder à ces molécules sont la plupart du temps décrites dans des brevets (230) (231).

II - ACIDES LACTONE CARBOXYLIQUES.

De nombreuses méthodes ont été mises en oeuvre pour préparer des acides butanolide carboxyliques (acides paraconiques) et buténolide carboxyliques (acides aconiques). L'utilisation de matières premières d'origines très diverses rend particulièrement difficile tout essai de classement des techniques employées. Il semble cependant que l'on puisse dégager deux voies d'accès essentielles :

- la méthode de CHUGAEV-ZERETINON
- la condensation de STOBBE

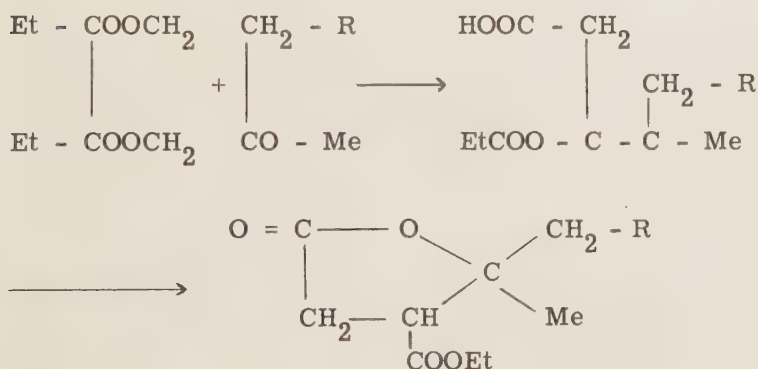
La première méthode fait appel aux diesters de l'acide α alcoyl α halogéno succinique que l'on traite par des monocétones en présence d'un métal activé. Les produits normaux de cette réaction sont des esters d'acides butanolide carboxyliques (94) (95) (96). Très voisine est la technique utilisée par DIXON (76) pour préparer des buténolides acides à partir d'un diester succinique. Par un procédé un peu plus complexe SHAKHMAZARYAN (208) prépare des butyrolactones carboxyliques à partir d'acides γ - γ dichloro alkyl acétiques.

En fait la plupart des méthodes décrites font appel à des esters de l'acide succinique ou à leurs dérivés. C'est ainsi que KATO (147) prépare des lactones acides par condensation d'un diester succinique substitué avec le bromacétate de méthyle en présence de méthylate de sodium.

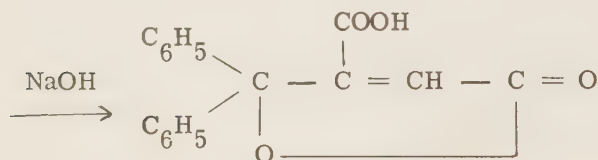
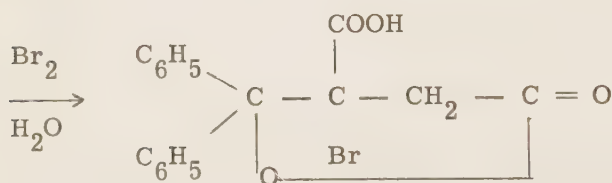
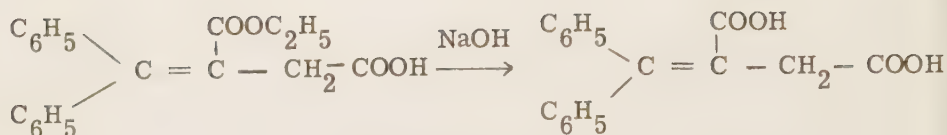
ISKOV (185) condense l'éthoxycarbonyl succinate de diéthyl avec la para formaldéhyde en présence d'éthylate de sodium dans l'éthanol. MIKAILOV (171) obtient des acides benzyl-4 paraconiques en condensant dans les mêmes conditions le benzyl-4 succinate de diéthyle et le formiate d'éthyle.

D'autres auteurs utilisent des esters acéto-acétiques (214) ou des esters maloniques (23).

La condensation de diesters avec des aldéhydes et des cétones prend classiquement le nom de réaction de STOBBE. On peut utiliser en particulier comme diesters, soit des diesters succiniques (134) soit des diesters itaconiques (148). C'est en utilisant ces méthodes qu'ont été préparés les produits que nous avons testés, aussi les décrirons-nous en détail lorsque nous aborderons les acides spirolactone carboxyliques. Parmi les techniques similaires permettant d'accéder à des composés non spiraniques, nous citerons la réaction décrite par ELLIOT (83) qui utilise le chlorure stannique dans le benzène pour cycliser en lactones les hémiesters obtenus par la réaction de STOBBE :



Par une méthode voisine JEFFERY et FRY (133) préparent des acides butanolide carboxyliques à partir des quels ils accèdent aux buténolides correspondants :



Enfin STACY (215) prépare directement des buténolides acides en condensant l'acétone avec l'oxalate de diéthyle mais n'obtient que des rendements médiocres.

En dehors de ces méthodes existent des voies d'accès très variées. Certaines font appel à des composés naturels. C'est ainsi que KAWAMOTO oxyde du cinéol par l'acide nitrique (149) ou le permanganate de potassium (150) pour préparer des acides γ diméthyl butyrolactone carboxyliques (ou acides térébiques). Ces mêmes composés peuvent être formés par ozonisation de la Pyrocine obtenue à partir d'acides chrysanthémiques naturels (170).

On peut aussi accéder à ces acides sans utiliser de composés naturels : ainsi la photolyse d'une solution de benzophénone et d'acide maléique dans l'isopropanol fournit 50 p. 100 d'acide térébique (186). La même réaction peut être appliquée à un mélange d'acide fumarique, de butanol et d'antraquinone (204) (205). D'une façon générale il s'agit d'une réaction d'addition d'alcool sur la double liaison des acides $\alpha - \beta$ insaturés que l'on peut initier par une quinone et les rayons ultra-violet (79).

D'autres procédés faisant appel à l'emploi d'oléfines que l'on traite par exemple par l'aldéhyde formique en présence d'acide sulfurique (249) ou par un anhydride comme

l'anhydride maléique (183) permettent d'obtenir des acides méthyl butyrolactone carboxyliques. De tels composés peuvent être également obtenus par condensation d'un aldéhyde avec un ester α acétyl succinique en présence d'un catalyseur acide ou basique (155).

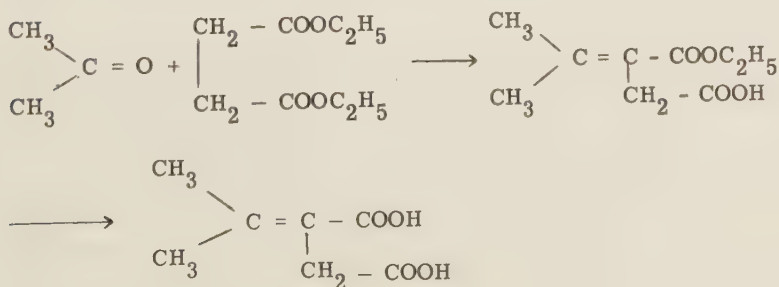
III - LES ACIDES SPIROLACTONE CARBOXYLIQUES.

Parmi les voies d'accès aux acides spirolactone carboxyliques la plus fréquemment utilisée est la réaction de STOBBE (218) : condensation à chaud d'un ester de l'acide succinique avec une fraction carbonylée, en présence d'une base forte. Les conditions expérimentales relativement sévères de cette réaction constituent parfois un inconvénient sérieux, en particulier dans le cas des hétérocycles. Il est alors préférable de faire appel à la méthode décrite par KATSUKA (148) qui consiste à condenser à froid des esters de l'acide itaconique avec une fonction carbonylée en présence de méthylate de sodium. On obtient dans ce cas des acides spirolactone carboxyliques insaturés en une seule étape. Ils peuvent être facilement réduits en dérivés saturés correspondants.

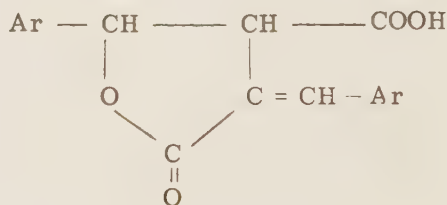
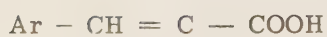
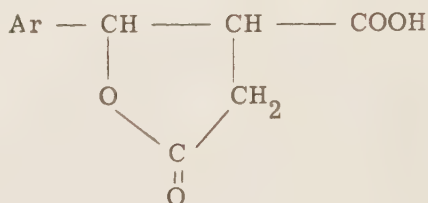
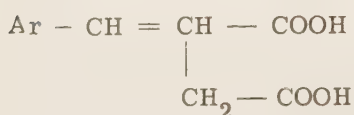
A - Condensation de STOBBE.

C'est en 1893 que STOBBE (218) condense l'acétone avec le succinate de diéthyle en présence d'éthylate de sodium.

Il obtient de l'acide diméthyl itaconique résultant de la réaction entre le groupement carbonyle de la cétone et le groupement méthylène α de l'ester. On admet que l'on passe par l'intermédiaire d'un hémioester :

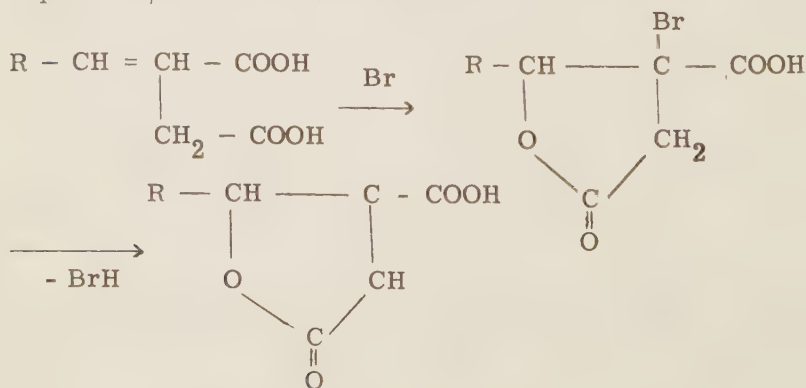


Cette réaction a été appliquée par la suite à de nombreux dérivés carbonylés. Ainsi avec les aldéhydes aromatiques, suivant les conditions opératoires, on peut obtenir quatre types de composés : des acides aryl méthylène succiniques des acides paraconiques, des acides bis-aryl méthylène succiniques et les acides lactoniques correspondants (219)(61) (115) :

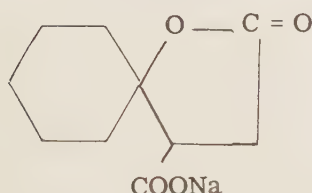


Avec les cétones on obtient le plus souvent des hémiesters.

Ces hémiesters et les acides alkyldène succiniques traités par le brome donnent des acides ou des esters bromoparaconiques substitués. Ces dérivés à chaud perdent une molécule d'acide bromhydrique pour donner des acides lactoniques $\alpha - \beta$ insaturés :

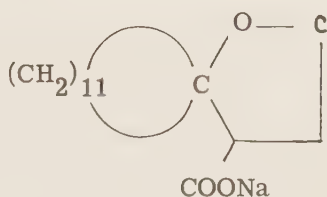


Les acides lactoniques saturés peuvent être obtenus par lactonisation directe des hémiesters. C'est par cette méthode que JOHNSON, qui a par ailleurs publié une revue détaillée sur la méthode de STOBBE (134) obtient le carboxy-3 cyclohexane spiro-4 butanolide 4 à partir de la cyclohexanone (135). Cette technique a été utilisée pour préparer les produits PC 325 et PC 326 que nous avons testés :



PC 325

Sel sodique du carboxy-3
cyclohexane spiro-4 butanolide-4



PC 326

Sel sodique du carboxy-3
cyclododécane spiro-4 butanolide-4

Nous ne donnerons pas ici le mode opératoire détaillé de ces préparations qui a été développé par ailleurs (32) Nous en rappelons simplement le principe et le mécanisme.

La cétone (cyclohexanone ou cyclododécanone) est condensée avec un excès de succinate de diéthyle. On opère à ébullition, sous azote, en présence de tert-butylate de potassium dans l'alcool tert-butylique anhydre.

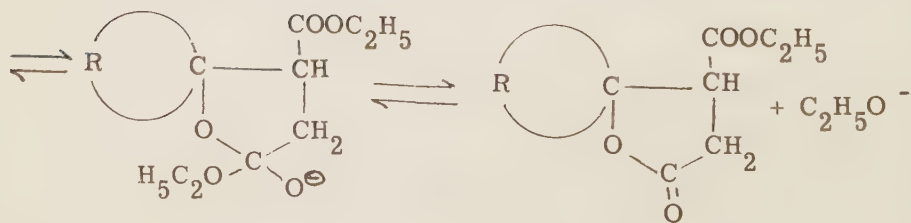
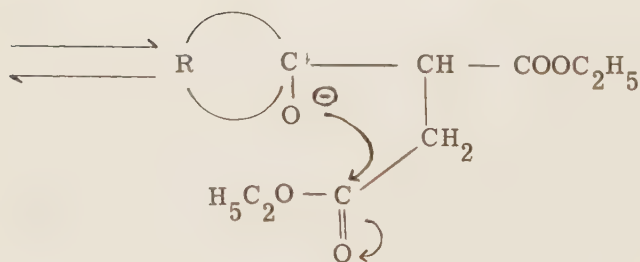
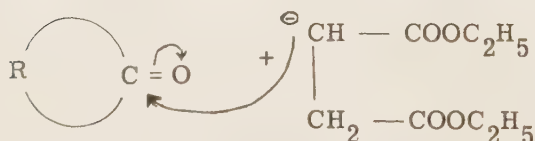
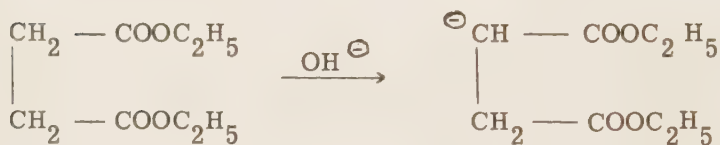
L'hémiesther huileux obtenu est ensuite lactonisé par chauffage au bain-marie dans l'acide chlorhydrique concentré.

Par refroidissement on a précipitation du butanolide acide. Notons que dans le cas de la cyclododécanone, la cyclisation n'a pu être réalisée que dans l'acide sulfurique concentré au voisinage de 0° C.

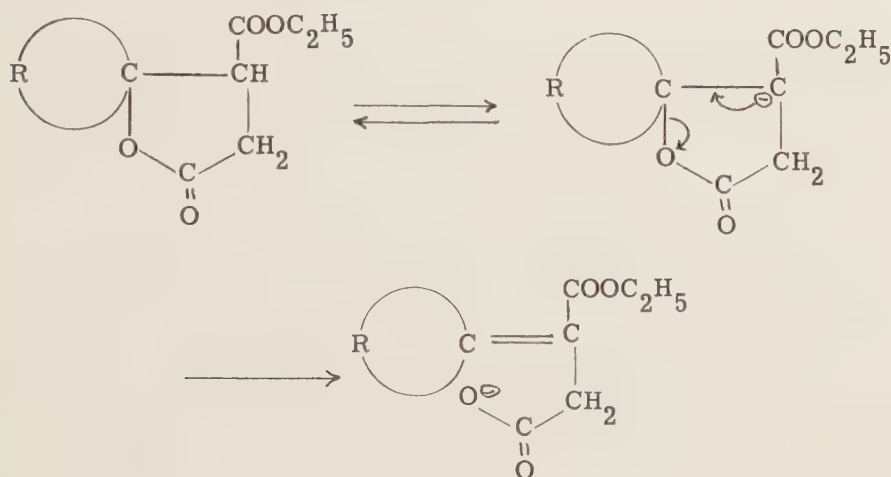
Il se forme alors une lactone ester qu'il faut ensuite hydrolyser en milieu alcalin.

On peut admettre que le mécanisme réactionnel est le suivant :

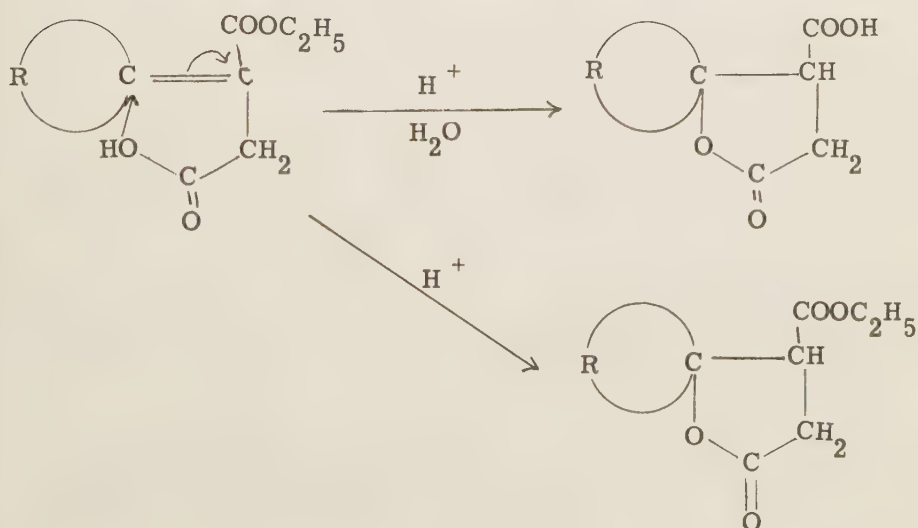
Dans un premier temps le succinate de diéthyle en milieu alcalin forme un carbanion qui attaque le composé carbonylé pour donner un dérivé chargé. Ce dernier, par élimination d'éthanol se cyclise pour donner une lactone :



Dans un deuxième temps on a ouverture de l'anneau lactonique et formation d'un hémioester.

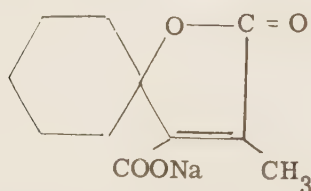


En milieu acide l'hémioester se cyclise en donnant un acide lactone carboxylique saturé en présence d'acide chlorhydrique alors que l'acide sulfurique conduit à l'ester :



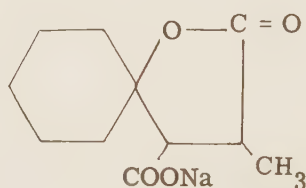
B - Méthode de KATSUTA

KATSUTA (148) utilise comme ester l'itaconate d'éthyle (méthylène succinate de diéthyle) qu'il condense avec diverses cétones, telles l'acétone et la cyclohexanone, dans l'éther anhydre en présence d'éthylate de sodium. La grande réactivité de l'itaconate permet d'opérer à basse température et d'obtenir des buténolides acides en une seule étape. Ceux-ci peuvent être facilement réduits en dérivés saturés par l'amalgame de sodium. Par cette technique ont été préparés à partir de la cyclohexanone, de la N-méthyl pipéridine et de la N-benzyl pipéridine, quatre produits que nous avons testés :



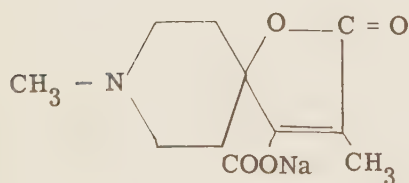
PC 343

Sel sodique du méthyl-2 carboxy-3 cyclohexanespiro-4 butène-2 olide-4



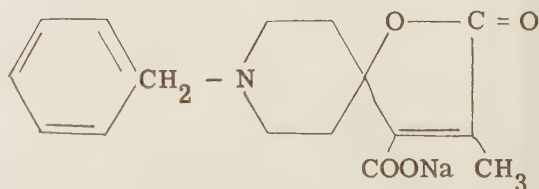
PC 343 a

Sel sodique du méthyl-2 carboxy-3 Cyclohexanespiro-4 butanolide-4



PC 359

Sel sodique du méthyl-2 carboxy-3 (N-méthyl pipéridinium-4' spiro) 4 butène-2 olide-4



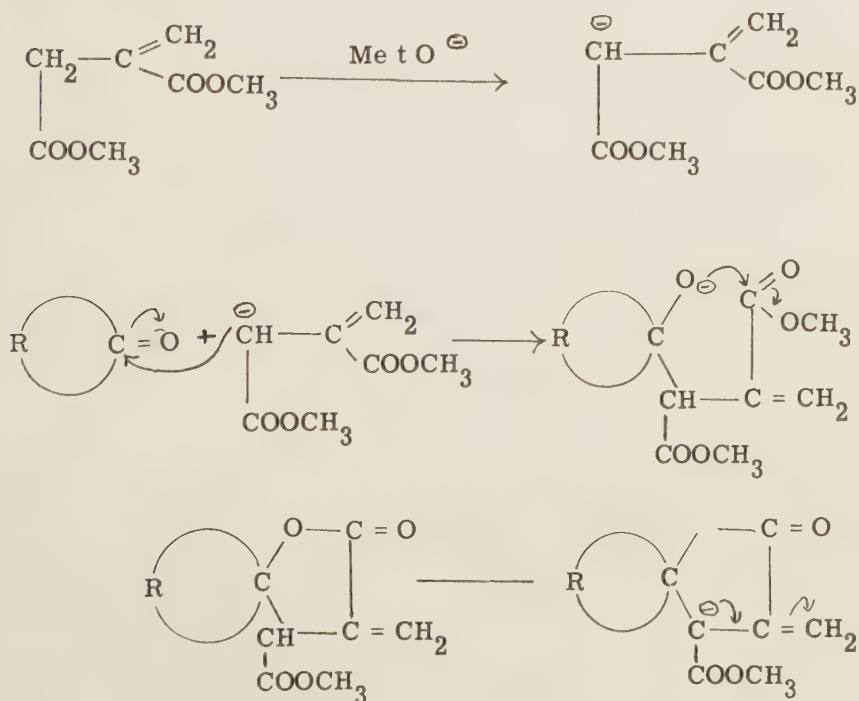
PC 360

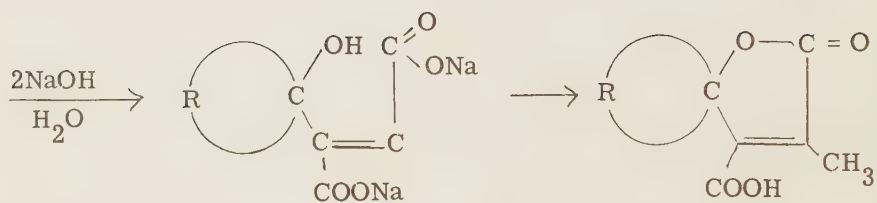
Sel sodique du méthyl-2 carboxy-3 (N-benzyl pipéridinium-4' spiro) 4 butène-2 olide-4.

Au point de vue pratique, un mélange équimoléculaire de cyclanone et d'itaconate de méthyle est mis à réagir en présence de méthylate de sodium au sein d'éther anhydre et au bain de glace. Après évaporation de l'éther et passage en milieu aqueux, l'acidification par l'acide chlorhydrique cyclise le produit de condensation qui précipite. Dans le cas des cyclanones azotées, on obtient un chlorhydrate soluble qui est isolé par évaporation de la phase aqueuse.

Le mécanisme de la réaction paraît être le suivant :

En présence de méthylate on a formation d'un carbanion correspondant à l'itaconate de méthyle. Ce carbanion attaque la cétone cyclique pour donner un intermédiaire chargé qui se cyclise par élimination de méthanol en donnant un butanolide acide. Celui-ci par prototropie donne un buténolide. Le passage en milieu aqueux libère de la soude à partir du méthylate : il se forme un sel disodique qui est lactonisé en présence d'acide chlorhydrique.



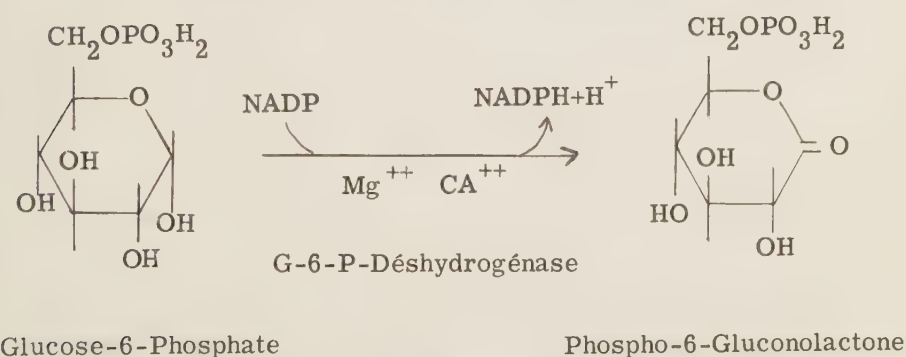


CHAPITRE III

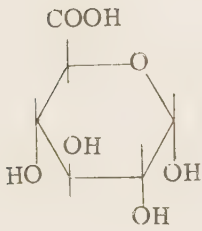
LES LACTONES EN BIOLOGIE

La synthèse de composés lactoniques par les organismes vivants est un processus fréquent dans le règne végétal qui a fourni à la thérapeutique de nombreuses substances médicamenteuses de première importance. Par contre les réactions mises en jeu dans le monde animal engendrent plus rarement des métabolites de structure olidique.

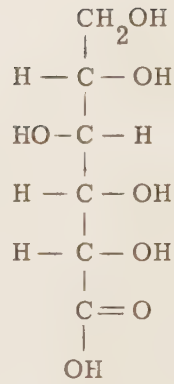
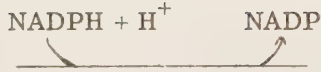
On peut cependant citer la formation de la phospho-6 gluconolactone à partir du glucose-6-phosphate au cours de la voie des pentoses :



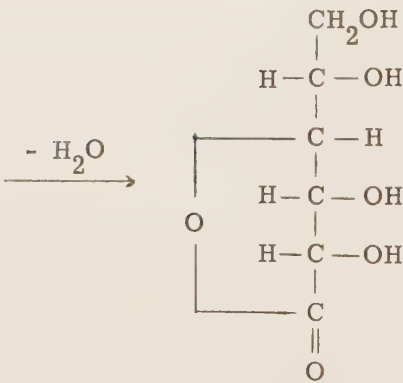
De même, le métabolisme de l'acide glucuronique aboutit chez certaines espèces animales à la formation de composés lactoniques qui, par oxydation, peuvent donner de l'acide L-ascorbique



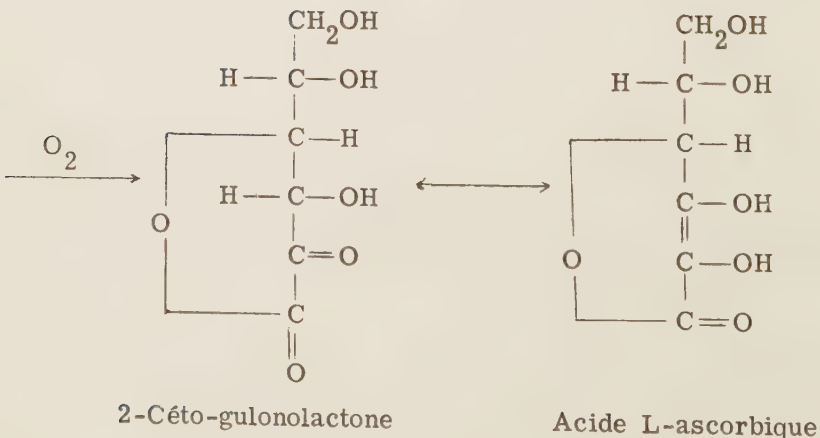
Acide Glucuronique



Acide Gulonique



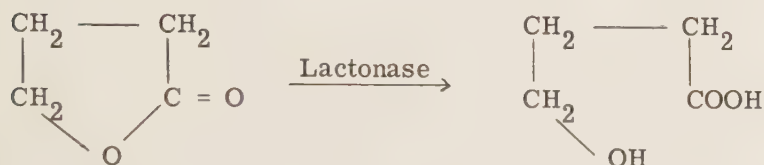
L Gulonolactone



2-Céto-gulonolactone

Acide L-ascorbique

Enfin, au niveau du tissu cérébral, certains auteurs (194) considèrent que le 4-hydroxybutanoïque est un médiateur chimique actif qui proviendrait de la transformation de la γ butyrolactone sous l'influence d'une lactonase spécifique présente dans le sérum et le foie :



Notons que cet olide 1-4 injecté à des rats augmente le taux d'acétylcholine de 50 p. 100 dans le cerveau (100). Aussi, pour d'autres auteurs (20) le médiateur actif serait-il la lactone.

Outre ces composés, il existe de nombreuses substances olidiques d'origine synthétique douées d'effets biologiques intéressants. Il n'entre pas dans nos intentions de dresser une liste complète des lactones d'origine naturelle ou de synthèse pouvant présenter un intérêt pharmaceutique. Nous essaierons simplement, dans le cadre de nos recherches personnelles, de voir quels sont les points d'impact possibles de ces molécules au niveau des systèmes enzymatiques et quelles sont leurs propriétés pharmacologiques essentielles.

I - LACTONES ET ENZYMES.

Si l'on excepte les études publiées sur l'ATPase membranaire et la chymotrypsine dont nous reparlerons dans la partie expérimentale, il existe dans la littérature peu de travaux concernant l'effet des composés lactoniques sur des réactions enzymatiques.

Cependant la γ butyrolactone a attiré l'attention en raison du rôle biologique de l'hydroxy-4 butanoïque.

C'est ainsi que WOLLEMAN et DENENYI (246) (247) ont essayé d'établir des rapports entre les métabolismes des acides γ amino-butyrique et γ hydroxybutyrique.

Dans son dernier ouvrage (245) WOLLEMAN rapporte l'essentiel de leurs observations.

Les auteurs injectent à des rats et des lapins du 4-hydroxybutyrate à la dose de 500 mg/kg puis travaillent sur des extraits cérébraux éthanoliques. Ils notent une légère augmentation de la décarboxylase glutamique alors qu'ils n'observent aucune modification in vitro. L'acide alcool réduit d'autre part la nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) mais n'aurait aucune influence sur l'oxydation de l'acide lactique au niveau du cerveau : il semble en effet que la déshydrogénase lactique cristallisée ne favorise pas l'oxydation de l'acide 4-hydroxy butyrique contrairement aux résultats obtenus par FISHBEIN et BESSMAN (90). Les observations de ces derniers auteurs seraient dues au fait qu'ils ont opéré en présence de semi-carbazides qui augmentent à eux seuls la réduction du NAD en présence de déshydrogénase lactique.

D'autre part, WOLLEMAN (244) démontre que l'alcool déshydrogénase cristallisée de levure ou de foie catalyse l'oxydation du 4-hydroxy-butyrate. Cette enzyme faisant défaut dans le tissu cérébral, il est possible que celui-ci renferme une 4-hydroxy butyrate déshydrogénase spécifique (113).

La présence de 4-hydroxy butyrate et de butyrolactone au niveau de ce tissu reste d'ailleurs un problème controversé même dans les conditions physiologiques : ainsi GIARMAN et ROTH (99) n'ont pas réussi à le mettre en évidence à l'aide de la chromatographie en phase gazeuse dont la sensibilité est de l'ordre de 10^{-6} M, alors que selon BESSMAN et FISHBEIN sa concentration au niveau du cerveau serait de l'ordre de 10^{-3} M (19).

Quoiqu'il en soit le problème de l'oxydation du 4-hydroxy butyrate n'est pas encore résolu. En effet, outre l'intervention possible de la déshydrogénase lactique ou d'une déshydrogénase spécifique, certains auteurs supposent que la β - hydroxy butyryl CoA déshydrogénase est susceptible de jouer un rôle (236).

En dehors de ces médiateurs du système nerveux d'autres substances naturelles ont attiré l'attention des chercheurs, en particulier les aldono-lactones (157). Celles-ci se comportent en effet comme des inhibiteurs des glucosidases chez les mammifères. C'est en 1940 que EZAKI (86) rapportait l'effet dépresseur exercé par la glucono- γ -lactone et la galactono- γ -lactone sur l'activité β glucosidase. Deux ans plus tard HORIKOSHI (123) faisait la même observation à propos de la β galactosidase.

On a longtemps attribué le pouvoir effecteur de ces composés aux acides aldoniques correspondants (173).

L'inhibition de la β glucuronidase par la glucaro- γ lactone est en fait la première interaction entre glucosidase et aldono-lactone qui ait été établie de façon nette (156). Il fut alors démontré que l'activité de l'acide glucarique en solution pouvait être attribuée à la présence, à l'état de traces, d'une forme olidique. De la même façon on put mettre en évidence l'effet inhibiteur exercé par la glucono- γ -lactone et la glucono- δ -lactone sur la β glucosidase issue de cultures microbiennes (58).

Ces travaux furent à l'origine de nombreuses recherches faisant appel à des préparations enzymatiques de diverses origines destinées essentiellement à étudier les problèmes de spécificité posés par ces réactions (59) (168) (88) (159).

A la suite de ces observations on a longtemps pensé que la similitude de structure entre l'anneau lactonique et le cycle pyranique ou furanique des sucres n'était pas un facteur important de l'activité des composés olidiques. Cependant des travaux plus récents permettent d'infirmer cette théorie. Ainsi dans le cas de la β -galactonidase et de l' α -1-Fucosidase, le pouvoir inhibiteur de la galactono- γ -lactone et de la fucono γ lactone, est lié à la possibilité de formation d'un isomère δ instable en solution (160). De même l'effet dépresseur exercé sur l' α mannosidase est étroitement lié à la configuration de la lactone ; en effet, la mannono 1- δ lactone est 300 à 500 fois plus active que l'olide 1-4 (158). De nouvelles recherches sur les glucono-lactones confirment ces observations : si les deux formes γ et δ peuvent agir sur les α et β glucosidases, la forme δ est toujours l'inhibiteur le plus puissant (160).

En dehors des aldonolactones et de la γ -butyrolactone, d'autres composés lactoniques ont manifesté un pouvoir effecteur vis-à-vis de divers systèmes enzymatiques.

Ainsi il semble que l'activité de l'uréase soit inhibée par diverses butyrolactones substituées, l'angéicalactone, la patuline et l'isopatuline (2) alors que la déshydroisopatuline diminue fortement les activités ATPasique et cholinestérasique (12).

D'autres auteurs rapportent des variations des activités ATPasique et lactate déshydrogénasique sous l'influence du digoxoside (167) ou d'acides spirolactone carboxyliques (32), ces derniers dérivés dépriment d'autre part l'activité cholinestérasique in vitro. Cette même activité est inhibée de façon très nette au niveau du plasma humain, par la benzyl-2-amino-5 γ valérolactone (213).

Des études plus nombreuses concernent l'hydrolyse enzymatique des composés lactoniques. Ceux-ci ne semblent pas se comporter comme des substrats ordinaires pour les estérases et leur hydrolyse est catalysée par une variété d'enzymes désignées sous le nom de lactonases (178).

Aujourd'hui trois classes de lactonases semblent différenciées : celles qui ouvrent le cycle des acides uroniques cyclisés ou urono lactonases ; celles qui hydrolysent les acides aldoniques cyclisés ou aldonolactonases et celles qui agissent sur les δ lactones provenant d'une déshydrogénation des sucres simples ou gluconolactonases.

Parmi les uronolactonases peu étudiées, nous citerons simplement la glucurono- γ -lactonase mise en évidence dans le foie de rat par EISENBERG (85). Cette enzyme est présente dans les microsomes mais non dans la fraction soluble

La gluconolactonase (3. 1. 1. 17) (9) agit sur plusieurs substrats tels la D-glucono- δ -lactone, la D-glucono- γ -lactone, la D-galactono- δ -lactone et la δ lactone lactobionique issue de la déshydrogénation de l'acide lactique. Elle a pu être mise en évidence chez les bactéries, dans la levure et différents tissus animaux (34). Son pH optimum est de l'ordre de 6 et elle n'agit qu'en présence de cations bivalents Mg^{++} , Mn^{++} ou CO^{++} .

L'aldonolactonase (3. 1. 1. 18) hydrolyse la D ou L - gulono γ lactone en acide gulonique.

Elle agit également sur la D-galactono γ lactone, la D arabono γ lactone, la D-ribono- γ -lactone (46) (45). Son pH optimum est de l'ordre de 8 alors qu'à pH légèrement acide elle catalyse la réaction inverse.

Il en est de même pour la lactonase isolée par FISH-BEIN et BESSMAN (9) (92) à partir du foie de rat et du plasma humain.

Cette enzyme, localisée dans les microsomes hydrolyse les composés renfermant quatre à huit atomes de carbone. Les cations bivalents semblent indispensables à son activité mais leur effet est différent suivant le pH et le sens de la réaction.

D'autres lactonases ont été étudiées : ainsi on a découvert dans *Actinomyces missouriensis* deux variétés de lactonases dont l'une hydrolyse de façon spécifique l'Actinomycine tandis que l'autre hydrolyse d'autres antibiotiques peptidiques, telle la Staphylomycine (179).

On a également signalé des thiolactonases de spécificité étroite mais leur existence est encore hypothétique (178).

II - PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES DES LACTONES.

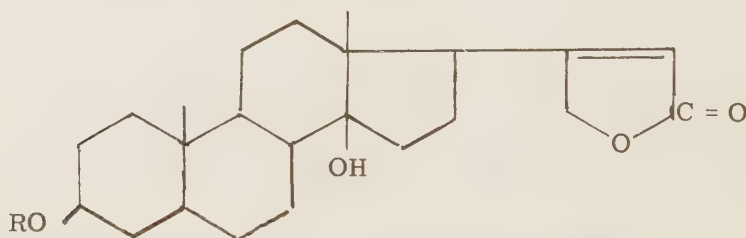
L'étude de la fonction lactone en pharmacodynamie a déjà fait l'objet de plusieurs mises au point (116) (224) (63) (32) aussi limiterons-nous volontairement notre bibliographie, en insistant surtout sur la diversité des propriétés des composés lactoniques. Ceux-ci agissent en effet non seulement au niveau du système cardiovasculaire et du système nerveux central mais manifestent encore des effets anthelminthiques, antibactériens, antiviraux et diurétiques.

D'une façon générale ces activités pharmacodynamiques marquées vont de pair avec une toxicité élevée (151) et de nombreuses lactones sont douées de pouvoir cancérogène.

A - Activité cardiovasculaire.

Elle est surtout le fait de composés de structure cyclopentanophénanthrénique, le plus souvent d'origine végétale. Il s'agit essentiellement de génines d'hétérosides naturels que l'on peut ranger en trois sous-groupes : les cardénolides, les bufadiénolides et les scilladiénolides.

Les cardénolides sont des stéroïdes de type digitoxine à 23 atomes de carbone portant en position 17 un cycle lactonique insaturé :



TYPE DIGITOXINE

R = COPULE OSIDIQUE.

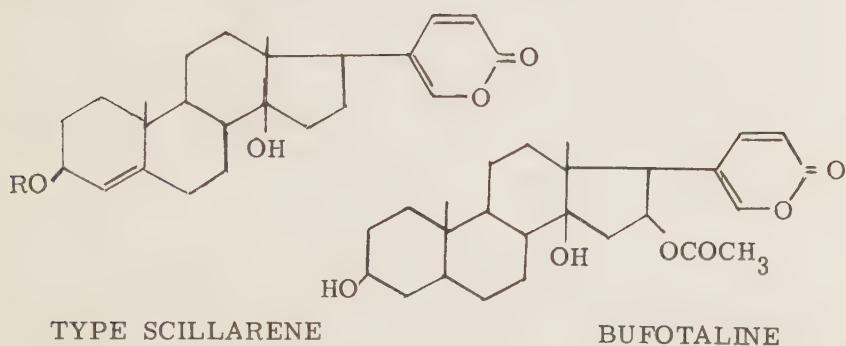
A ce groupe appartiennent entre autres les hétérosides de la Digitale pourpre et de la Digitale laineuse (Scrofulariacées), des Strophantus (Apocynacées) et de l'Adonis (Renonculacées) c'est encore à ce type que se rattachent le Gomphoside de Gomphocarpus fruticosus et le Graciloside de Strophantus gracilis.

Les Scilladiénolides et les Bufadiénolides sont des stéroïdes à 24 atomes de carbone porteurs en position 17 d'un cycle lactonique hexagonal insaturé.

Les premiers sont des hétérosides de diverses Liliacées telles la Scille, l'Hellébore et les Boweia appartenant au type Scillarène A.

Les seconds sont des poisons cardiaques extraits du venin glandulaire de crapaud, chez lequel la substance initiale de sécrétion paraît être la butotoxine qui par hydrolyse

libère de l'arginine, de l'acide subérique, une lactone : la bufotaline :



Il faut noter que si la configuration stéréochimique du noyau stéroïdique est essentielle à l'activité de ces composés, le cycle olidique insaturé joue également un rôle important. Ainsi toute réduction (129) (53) ou ouverture (225) de l'anneau lactonique rend ces substances pratiquement inactives.

En dehors de ces composés naturels de nombreux analogues structuraux à tropisme cardiovasculaire ont été préparés par synthèse (242) (40) (189).

Enfin de nombreux dérivés lactoniques de structure plus simple tels que certains phénylbuténolides (206) manifestent in vitro et in vivo, une activité cardiotonique et vasodilatatrice importante.

B - Activité sur le système nerveux central.

Les études publiées au cours de ces dernières années concernent essentiellement la *γ* butyrolactone dont nous avons déjà parlé en tant que médiateur du système nerveux.

L'injection de ce composé chez l'animal entraîne un abaissement très net de la vigilance (16). Chez l'homme il est utilisé sous forme de *γ* hydroxybutyrate de sodium (★) comme anesthésique intraveineux atoxique (15). Son effet

(★) Gamma OH N.D. Equilibre biologique S.A.

hypnogène dure de 30 minutes à 2 heures et il ne provoque ni défaillance circulatoire ni dépression respiratoire. Il semble d'autre part dépourvu de toxicité vis-à-vis des tissus hépatiques et rénaux. Certains auteurs (111) (112) ont étudié le mécanisme d'action de ce composé et de ses dérivés en cherchant notamment à établir des corrélations entre les effets hypnogènes ou tranquillisants et les effets convulsivants que l'on peut parfois mettre en évidence à l'électroencéphalogramme (48).

Notons que les propriétés hypnosédatives de la butyrolactone elle-même peuvent être renforcées par l'introduction de groupements uréides et donner naissance à des composés à effet antiépileptique (33).

Des lactones plus complexes telles que les dérivés de synthèse de l'acide coumarine carboxylique ou des substances naturelles de même type comme le Bergapène et la Pimpinelline possèdent également une action hypnogène importante (116).

On peut rapprocher de ces composés lactoniques un certain nombre de médicaments de synthèse dans lesquels le cycle olidique renferme un atome d'azote. Il s'agit des oxazolones désignées encore sous le nom d'azaspiroalcanones. Ces produits possèdent des activités variées au niveau du système nerveux central et périphérique.

Parmi eux nous citerons le Fenspiride (★) dont nous reparlerons au sujet de nos recherches pharmacologiques. Des dérivés voisins à propriétés neuroleptiques sont d'autre part décrits dans des brevets récents (41) (43).

Enfin on peut rattacher à ce chapitre l'action antalgique manifestée par certaines lactones, telle la lactone polycyclique extraite d'*Helenum amarum* (229).

C - Activité anthelminitique.

Plusieurs substances naturelles douées de propriétés vermifuges renferment un cycle γ lactonique. Ainsi en est-il de la Santonine découverte en 1830 et utilisée depuis

(★) Viarespan N. D. Servier.

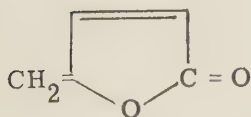
longtemps en thérapeutique, en particulier contre les ascarides. Il semble encore ici, que l'ouverture de l'anneau lactonique entraîne la perte des propriétés. L'Hélénine ou Alantolactone retirée des racines d'*Inula Helenium* aurait une activité supérieure et une toxicité moindre (124). Enfin la coumarine, δ lactone de l'acide orthoxycinnamique, qui a servi surtout à la préparation de dérivés synthétiques anticoagulants, est également à l'origine de composés à propriétés vermifuges (127).

D - Activité antibactérienne et antivirale.

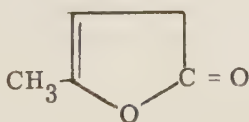
Cette activité se rencontre fréquemment dans les composés lactoniques et de nombreux " Antibiotiques des Végétaux supérieurs " de structures très variées comportent un cycle olidique.

Le plus simple des composés lactoniques la β propiolactone est utilisée comme agent conservateur dans les solutés pharmaceutiques pour l'usage externe.

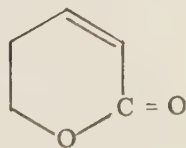
Elle manifeste des effets antibactériens, mais possède également une action virulicide en particulier contre la variole, la fièvre jaune et la psittacose (70). Le méthylène-4 buténolide-4 ou protoanémonine doublement insaturé, est beaucoup plus actif que la lactone saturée correspondante. Cette substance est non seulement bactériostatique (6) mais aussi tuberculostatique (77), fungistatique (22), antivirale et anti-protozoaire (223). Enfin, parmi les composés de structure simple, mais d'activité beaucoup plus modeste, il faut citer l'Angélicallactone et l'acide parasorbique.



PROTOANEMONINE



ANGELICALACTONE



ACIDE
PARASORBIQUE

La structure coumarinique est également à l'origine d'activités antibactériennes. Si la coumarine elle même est peu active, l'Ombelliferone ou hydroxy-7 coumarine agirait sur Brucella abortus et Brucella melitensis (81).

La pluméricine et la Fulvoplumiérine, composés voisins, manifesteraient une forte action bactériostatique (107) (163).

On a également signalé l'activité antibactérienne de γ lactones α aminées substituées par des groupements méthyl ou pentyl (87). Par contre des olides 1-4 substitués par la morpholine et un cycle aromatique (64) ont donné des résultats moins satisfaisants.

Certains antibiotiques du groupe des Macrolides renferment des anneaux lactoniques de grande dimension (12 à 20 atomes de carbone). C'est le cas en particulier de l'Erythromycine. Ces composés utilisent la synthèse protéique par effet compétitif avec les amino-acides liés au t-RNA au niveau des ribosomes. Ils n'ont aucune action sur l'activation des amino-acides, ou la fixation du m-RNA sur les polyosomes. Il semble que les macrolides de pK élevé agissent uniquement sur la formation des complexes peptide-t RNA- ribosomes alors que ceux qui ont un pK plus faible agiraient à la fois sur les amino-acides - t RNA et les peptides-t RNA. D'autre part ces composés manifestent une activité plus importante en solution alcaline qu'en solution acide (166).

Il faut faire enfin, une mention spéciale pour une substance découverte en 1942 à laquelle on a donné le nom de Patuline, expansine, clavacine, mycoïne. Cet antibiotique qui résulte de la juxtaposition d'un cycle pyranique hydrolysé avec un buténolide possède un spectre d'activité très large mais n'a jamais été utilisé en thérapeutique en raison de son action irritante et de ses effets nécrotiques sur les tissus.

E - Activités diverses.

Nous avons mentionné quelques unes des propriétés pharmacodynamiques importantes des lactones mais il en existe bien d'autres dont la dispersion dans la littérature rend difficile le recensement.

Les recherches les plus importantes concernent sans doute le groupe des spirolactones, inhibitrices de l'aldostérone.

De nombreuses recherches ont été consacrées à la synthèse d'analogues structuraux susceptibles d'entrer en compétition avec cette hormone au niveau du tube rénal. Nous reviendrons sur ces composés dans la partie expérimentale consacrée à l'étude de l'activité diurétique. Signalons néanmoins que ces produits possèdent d'autres propriétés. Aussi les utilise-t-on dans les oedèmes des cirrhoses hépatiques, les oedèmes des syndromes néphrotiques, les oedèmes cardiaques. A ces indications s'en ajoutent d'autres moins courantes comme l'hypertension artérielle avec hypokaliémie, les insuffisances cardiaques avec troubles de l'excitabilité myocardique, la myasthénie. On trouvera dans des revues d'ensemble récemment publiées, les détails pharmacologiques concernant ces dérivés (60) (101) (117).

En dehors de ce groupe homogène, de nombreux composés lactoniques possèdent une action sur le tractus gastro-intestinal. Ainsi les glucosides de la gentiane sont-ils doués d'une activité excito-secretoire très nette sur la muqueuse gastrique (63). L'Helenine (★) dérivés des Umbellifères et l'Ovatodiolide extrait de diverses Labiacées sont des substances cholérétiques et spasmolytiques.

La fonction lactone se retrouve encore dans des substances para-sympathomimétiques comme la Pilocarpine ou kératolytiques et hyperhémiantes comme la Thioxolone (★★) D'autre part, de nombreux composés olidiques possèdent des activités secondaires à côté de leur propriété essentielle : l'anémone bactériostatique est également rubéfiante, antitussive, analgésique ; l'Hélénine est un expectorant. Nous ne saurions oublier les propriétés oestrogéniques de certaines lactones dérivées de l'acide résorcylique (172) ni les androgènes anabolisants de synthèse porteurs d'un anneau penténolide (42). Enfin au niveau du règne végétal, nous rappellerons que les Gibberellines, hormones de croissance et de germination, sont aussi des composés olidiques (184).

(★) Cantabilène N.D. Medicia

(★ ★) Gelacnine N.D. Furt

F - Effets cancérigènes.

Les effets cancérigènes des lactones sont bien connus et ont fait l'objet de travaux récents et très approfondis (72) (73) (74). Il semble que l'activité carcinogénétique de ces substances soit en relation avec leur configuration structurale et leur aptitude à se combiner avec des groupements sulfhydrysés. Il y aurait d'autre part concordance entre le pouvoir cancérigène et la solubilité dans l'eau. (235) ou la sensibilité à l'hydrolyse : ainsi la β propiolactone qui s'ouvre facilement en milieu aqueux est-elle hautement cancérigène, tandis que la γ butyrolactone, moins facilement hydrolysable, ne l'est pas.

Des composés lactoniques plus complexes appartenant à la famille des Furocoumarines et connues sous le nom d'Aflatoxines manifestent également un fort pouvoir carcinogénétique. Ces substances sont élaborées par une moisissure banale et très répandue : l'*Aspergillus flavus* qui parasite en particulier les tourteaux d'arachide. Elles seraient à l'origine du cancer hépatique primitif que l'on observe chez diverses populations africaines.

Récemment des lactones polycycliques de structure voisine ont été synthétisées (21). Certaines, injectées à la souris, se sont révélées hautement cancérigènes (154).

Il semble que ces composés puissent induire des aberrations chromosomiques et des mutations génétiques. Quant à la β propiolactone elle agirait de façon spécifique sur certains amino-acides en particulier la Méthionine. (220)

De façon paradoxale, il existe des composés lactoniques doués d'activité antitumorale : ainsi en est-il de certaines coumarines naturelles présentes essentiellement dans les Ombellifères (226). De même un analogue structural azoté de l'hydroxy-buténolide, isolé en 1967, inhiberait la croissance des tumeurs chez les rongeurs et chez l'Homme (209). Dans cet esprit ont été préparées récemment des lactones bicycliques (175) en vue de déterminer leur effet antitumoral.

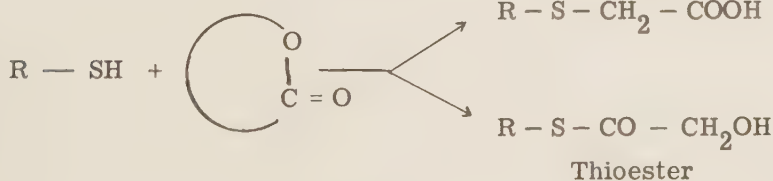
G - Toxicité et mécanisme d'action.

Les effets toxiques des composés lactoniques sont fréquents et nombreux . C'est ainsi que certains dérivés de la Patuline, semblent diminuer la respiration cellulaire et le taux de groupements sulfhydrylés au niveau du foie chez l'animal (3) (4). Ces mêmes substances comme il a déjà été signalé (2) inhibent plus ou moins l'activité de l'uréase.

De nombreuses toxines d'origine animale renferment également un cycle olidique. En dehors de la bufotoxine déjà citée, la monocrotaline isolée du venin de diverses espèces de crotales renferme le cycle de la *γ*-butyrolactone.

C'est essentiellement dans le cadre de ces effets toxiques qu'a été étudié le mécanisme d'action des lactones. Il s'agirait d'une action de type thioloprive. Réciproquement les substances à groupement thiol font disparaître l'activité physiologique des lactones. Ainsi la cystéine réagit facilement avec la propiolactone qui perd alors ces propriétés pharmacodynamiques (75). Deux sortes de composés pourraient se former au cours d'une telle réaction (224).

Thioether

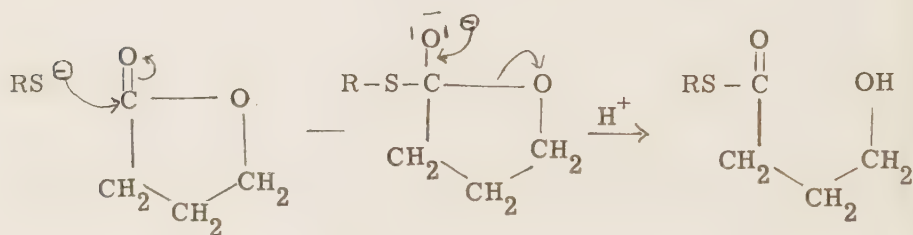


De même la Patuline voit disparaître son activité antibactérienne (98) (196) et ses propriétés cytotoxiques au contact de composés sulfhydrylés.

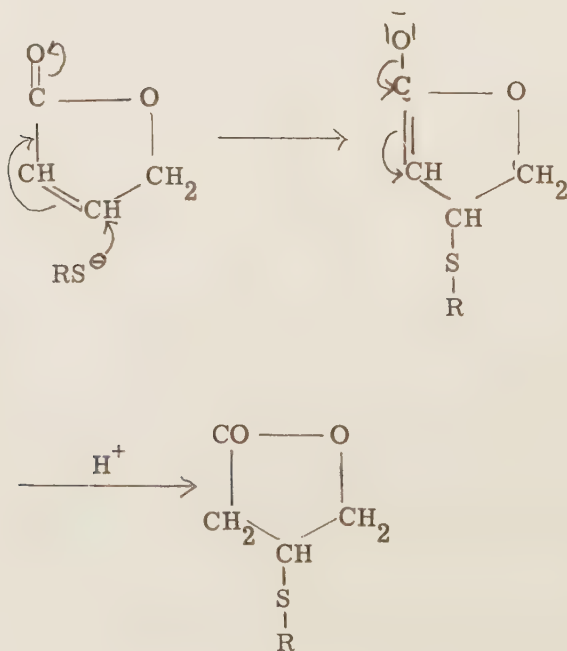
Par un mécanisme identique la butyrolactone réagirait avec le coenzyme A pour donner un thioester (71). A ce sujet nous nous permettons de proposer un mécanisme aboutissant à la formation d'un thioester ou d'un thioéther suivant que l'on est en présence d'un butanolide ou d'un buténolide.

Dans le cas des butanolides on peut supposer que le groupement carbonylé de la lactone subit une attaque nucléophile

de la part de la substance sulphydrylée. Il se forme un intermédiaire chargé qui peut capter un proton pour donner un thioester :



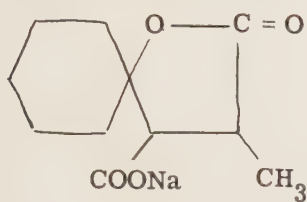
Dans le cas des buténolides, l'attaque nucléophile se ferait de façon préférentielle au niveau d'un carbone éthylénique.



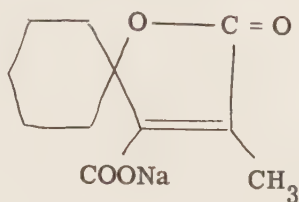
On a cependant proposé d'autres mécanismes d'action que celui impliquant l'intervention de groupements sulfhydrylés : ainsi la butyrolactone pourrait diminuer la toxicité de la digitoxine par un phénomène d'inhibition compétitive (62).

RECHERCHES PERSONNELLES

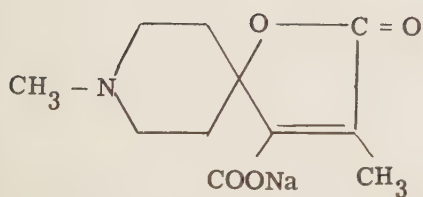
RAPPEL DE STRUCTURE DES COMPOSES TESTES.



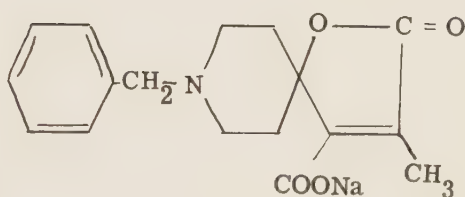
PC 343 a



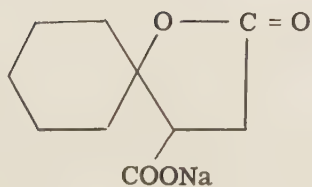
PC 343



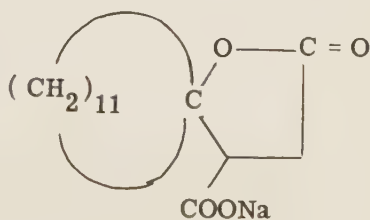
PC 359



PC 360



PC 325



PC 326

I - ENZYMOLOGIE

Les études enzymologiques ont été conduites in vitro à 25 ou 37° C, à partir d'enzymes naturelles représentées par des homogénats de foie, de rein et de pancréas de rats blancs de souche Sprague Dawley.

Les animaux sont sacrifiés par décapitation, les organes sont prélevés, lavés de leur sang et homogénéisés à l'Ultra-Turrax dans l'eau à 0° C. Les homogénats sont utilisés après dilution du 1/10e au 1/10 000 e suivant l'étude considérée.

Les différents composés à étudier sont introduits aux concentrations de 2 à 2,5 g par litre au début de la réaction.

ACTIVATION DES HOMOGENATS DE PANCREAS.

Les homogénats de pancréas doivent être activés par la trypsine afin de transformer le chymotrypsinogène et le trypsinogène en enzymes actives. L'activation du chymotrypsinogène s'effectue pendant deux heures à 4° C dans une solution contenant 1 cm³ d'homogénat 1/10 , 8 cm³ de solution tampon et 1 cm³ d'une solution de trypsine 1/2 500 e dans l'acide chlorhydrique millinormal. Celle du trypsinogène nécessite une durée de 15 heures. On opère dans les mêmes conditions mais avec une solution de trypsine deux fois plus diluée que la précédente.

CHAPITRE I

ACTIVITE CHYMOTRYPSIQUE

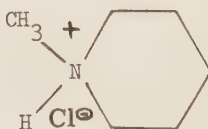
Dès 1931 BAMANN (7) (8) et plus tard STEENSHOLT (216) mettent en évidence l'influence des lactones, considérées comme des esters internes, sur l'activité de divers estérases. Des composés tels que, les lactones des acides γ hydroxybutyrique et γ hydroxyvalérique, la coumarine et la santonine, ne sont pas hydrolysés par ces enzymes. Mais si on leur ajoute l'ester méthylique de l'acide butyrique, ils inhibent très fortement l'hydrolyse de ce dernier. On peut donc admettre avec ces auteurs que les estérases sont capables de se combiner aux lactones pour former des complexes.

Tout récemment TOBIAS (222) arrive à des conclusions à peu près identiques avec l'alphachymotrypsine, protéase pancréatique douée d'activité estérasique. En effet il a réalisé une étude poussée de la réaction en utilisant des lactones des acides nitro-5-hydroxy-2-phénylacétique et nitro-5-hydroxy-2-phénylpropionique. Non seulement l'enzyme provoque l'ouverture des cycles lactoniques, mais le chromophore ainsi libéré s'unit à l'enzyme par une liaison covalente. L'auteur admet que cette liaison s'effectue au niveau du site actif de l'enzyme, tout au moins en ce qui concerne le premier composé. Les enzymes acylées auraient du reste perdu leur activité catalytique vis-à-vis de l'ester méthylique du N acétyl L-tryptophane.

Enfin BOYER (32) rapporte l'intense activité inhibitrice du buténolide dérivé de la N méthyl pipéridine sur les cholinestérases. Or, plusieurs faits plaident en faveur d'une

similitude des sites estérasiques des cholinestérases, de la trypsine et de la chymotrypsine. Nous citerons à cet effet : leur activité estérasique commune, l'existence d'inhibiteurs communs tels que les organo-phosphores (174) (239) (198) (199) (200) (201) (56), la présence de deux acides aminés, sérine et histidine, indispensables à leur activité catalytique. Cette présence a été mise en évidence au niveau du site estérasique des cholinestérases par WILSON (239), JANDORF (130), BRUCE (38) (39), HACKLEY (110) et BENDER (17) et se retrouve au niveau de la surface active de la chymotrypsine ainsi qu'en témoignent les expériences et hypothèses proposées par BENDER (18), STEWART (217) GUTFREUND (109) (108), WOOTTON (248) et SCHOELLMAN (207).

C'est l'ensemble de ces investigations qui nous a conduit à tester nos produits sur l'activité estérasique de la chymotrypsine et de la trypsine. Ces études ont porté d'une part sur les enzymes cristallisées et d'autre part sur les enzymes naturelles fournies par des homogénats de foie, rein et pancréas de rats blancs. Nous avons étudié les dérivés (PC 359, PC 360, PC 343 a, PC 343) et nous avons pensé qu'en comparant l'activité des produits (PC 360, PC 343 a, PC 343) avec l'activité du produit (PC 359), nous pourrions voir qu'elle était la part qui revenait à la fonction lactone et celle que l'on pouvait attribuer à l'azote chargé. Pour préciser le rôle de ce dernier groupement, il nous a paru utile d'étudier l'activité du chlorhydrate de méthyl-1-pipéridine.



Parmi les nombreuses méthodes de dosage de l'activité chymotrypsique, nous avons retenu la technique de KABACOFF (140).

I - PRINCIPE.

L'activité chymotrypsique peut être suivie par l'hydrolyse enzymatique de la N-acétyl-L-tyrosine-éthyl-ester (A. T. E. E.) en acétyl tyrosine. L'A. T. E. E. restant après incubation est transformé en acide hydroxamique qui donne une teinte marron avec les ions ferriques.

II - REACTIFS.

- Tampon phosphate 0,2 M à pH 7,6
- solution A : PO_4HNa_2 , 12 H_2O à 71,628 g/l.
- solution B : $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}^2$ anhydre à 27,218 g/l.

On mélange 87 cm^3 de A et 13 cm^3 de B. On vérifie le pH.

- Substrat : N-acétyl-L-tyrosine-éthyl-ester (ATEE)
0,00915 M

On dissout 115 mg d'ATEE NBCO dans 50 cm^3 de tampon phosphate. Cette solution doit être préparée extemporanément car sa conservation est très limitée.

- Chlorhydrate d'hydroxylamine à 13,9 g pour cent dans l'eau distillée.

- Solution de soude à 14 p. 100

- Solution alcaline d'hydroxylamine préparée en mélangeant les deux solutions précédentes à volumes égaux avant l'emploi.

- Acide chlorhydrique 4 N

- Solution de perchlorure de Fer 0,7 M

- FeCl_3 RP 32 cm^3
- eau distillée q. s. p. 100 cm^3

III - TECHNIQUE.

Dans chaque tube on introduit :

- 0,5 cm³ de solution enzymatique,
- 0,5 cm³ d'une solution à 1 p. cent de produit à étudier dans le tampon,
- 1 cm³ de la solution d'ATEE 0,00915 M.

Dans les tubes témoins, on remplace la solution de produit par 0,5 cm³ d'eau distillée.

On incube à 25° C pendant 30 minutes. On stoppe la réaction par addition de 2 cm³ de la solution alcaline d'hydroxylamine.

On attend 2 minutes puis on ajoute 1 cm³ d'acide chlorhydrique 4 N et 1 cm³ de FeCl₃ 0,7 M.

Il faut bien agiter après l'addition de chaque réactif. On attend 20 minutes et on lit au photolorimètre à 540 mμ.

On prépare les témoins suivants :

- Témoin zéro : 1,5 cm³ de tampon + 0,5 cm³ d'eau distillée.
- Témoin maximum : 1 cm³ de substrat + 1 cm³ d'eau distillée.
- Témoin hydrolyse spontanée : c'est le témoin maximum que l'on incube à 25° C.
- Témoin de coloration : 0,5 cm³ de solution enzymatique + 0,5 cm³ de solution de produit. On stoppe la réaction puis on ajoute 1 cm³ de la solution d'ATEE.

IV - ETALONNAGE.

La gamme étalon est réalisée en répartissant dans différents tubes : 1, 0,9 , 0,8 , ... 0,1 ; 0 cm³ d'une solution d'ATEE 0,00915 M, ce qui correspond à des pourcentages d'activité allant de zéro à cent. On complète à 2 cm³ et l'on procède à la coloration comme précédemment.

V - RESULTATS.

Le chlorhydrate de N méthyl pipéridine et le produit PC 359 ne manifestent aucun effet sur l'activité chymotrypsique au niveau du foie, du pancréas, ainsi que sur l'enzyme cristallisée, alors qu'ils se révèlent activateurs au niveau du rein.

Les produits PC 360, PC 343 a, PC 343 manifestent un pouvoir inhibiteur sensible au niveau du foie.

Activité chymotrypsique en μ moles d'ATEE hydrolysé par minute et par gramme de tissu frais ou μ mole d'enzyme cristallisée.

	Témoin	Produit PC 359	Produit A	Produit PC 360	Produit PC 343a	Produit PC 343
Rein 1/30	9, 15	13, 7	12, 8	9, 15	9, 15	9, 15
Foie 1/30	7, 32	7, 32	7, 32	4, 94	4, 75	5
Pancréas 1/10 000	2745	2745	2745	2780	2760	2745
Chymotrypsine cristallisée () 1/500 000	10300	10300	10300	10300	10300	10300

() Nous avons choisi pour l'alpha chymotrypsine cristallisée le poids moléculaire de 25 000 ainsi que le préconisent JANSEN (132) et HARTLEY (114).

ACTIVITE CHYMOTRYPSIQUE EN POURCENTAGE D'ATEE HYDROLYSE

		REIN 1/30				FOIE 1/30			
		T		A		T		A	
		I	II	III	IV	I	II	III	IV
		50	75	70	50	50	40	40	28
		50	+	+	50	-	-	-	-
		50	50	40	-	32	35	30	30

T : Témoïn ; I : PC 359 ; II : PC 360 ; III : PC 343 a ; IV : PC 343
A : chlorhydrate de N méthyl pipéridine.

		PANCREAS 1/10 000 ET				ENZYME CRISTALLISEE 1/ 500 000			
		T		A		T		A	
		I	II	III	IV	I	II	III	IV
		45	45	45	45	-	-	-	-
		45	45	45	45	-	-	-	-

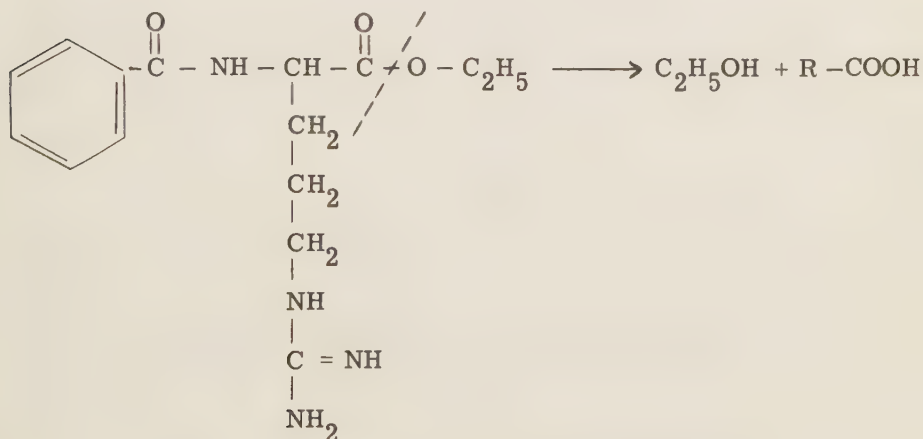
CHAPITRE II

ACTIVITE TRYPSIQUE

Nous avons utilisé la technique préconisée par BROWN (35) et modifiée par BASTIDE (11).

I - PRINCIPE.

L'activité trypsique suivie par l'hydrolyse enzymatique de l'ester éthylique de la benzoyl arginine catalyse la réaction :



Le substrat restant en fin d'incubation réagit en milieu alcalin sur le mélange hydroxylamine soude, puis en milieu acide sur le chlorure ferrique pour donner un complexe coloré qui se prête à une estimation photolorimétrique à 540 m μ .

II - REACTIFS.

- Solution d' α benzoyl-L-arginine éthyl ester 0,02 M
- B A E E ----- 0,3428 g
- eau distillée q. s. p. - 50 cm³

Cette solution stable à pH 3,6 doit être conservée à - 15° C.

- Tampon barbital 0,1 M à pH 7,8
- solution A : barbital sodique 10,3 g
eau distillée q. s. p. 500 cm³
- solution B : acide chlorhydrique 0,1 M

Le mélange tampon de pH 7,8 s'obtient en ajoutant 66,2 cm³ de A à 33,8 cm³ de B.

- Solution alcaline d'hydroxylamine.
- chlorhydrate d'hydroxylamine à 13,9 p. cent dans l'eau distillée.
- solution de soude à 14 p. cent.

La solution alcaline d'hydroxylamine est préparée en mélangeant les 2 solutions précédentes à volumes égaux. Elle doit être préparée extemporanément et ne se garde pas plus de 3 heures. La solution mère d'hydroxylamine est conservée à + 4° C.

- Acide chlorhydrique 3 N
- Solution de chlorure ferrique à 10 p. cent préparé dans HCl 0,1 M
- FeCl₃ RP ----- 21,4 cm³
- HCl 0,1 n q. s. p. 100 cm³
- Solution d'acide trichloracétique à 10 p. cent.

III - TECHNIQUE.

Dans chaque tube on introduit :

- 0,5 cm³ de solution enzymatique
- 0,5 cm³ d'une solution à 1 p. cent de produit à étudier dans le tampon.
- 0,5 cm³ de la solution tampon
- 1 cm³ de la solution de BAEE 0,02 M

Dans les tubes témoins, on remplace la solution de produit par $0,5 \text{ cm}^3$ de la solution tampon.

On incube à 37° C pendant 30 minutes. En fin d'incubation on stoppe la réaction par $1,5 \text{ cm}^3$ d'acide trichloracétique à 10 p. cent. Après agitation et centrifugation on prélève dans chaque tube 2 cm^3 de surnageant auxquels on ajoute 2 cm^3 de la solution alcaline d'hydroxylamine. Après agitation; on laisse reposer 5 minutes. On neutralise avec l'acide chlorhydrique 3 N jusqu'à obtention d'un pH voisin de 4. La lecture photolorimétrique à $540 \text{ m}\mu$ est effectuée 15 minutes exactement après l'addition de 2 cm^3 de la solution de chlorure ferrique à 10 p. cent.

On prépare les témoins suivants :

- Témoin zéro : 2 cm^3 de solution tampon + $0,5 \text{ cm}^3$ d'eau distillée.
- Témoin maximum : 1 cm^3 de substrat + $1,5 \text{ cm}^3$ de solution tampon.
- Témoin hydrolyse spontanée : c'est le témoin maximum que l'on incube à 37° C .
- Témoin de coloration : $0,5 \text{ cm}^3$ de solution enzymatique + $0,5 \text{ cm}^3$ de solution de produit + $0,5 \text{ cm}^3$ de solution tampon. On stoppe la réaction par $1,5 \text{ cm}^3$ d'acide trichloracétique à 10 p. 100, puis on ajoute 1 cm^3 de la solution de BAEE 0,02 M.

IV - ETALONNAGE

La gamme étalon est réalisée en répartissant dans différents tubes : 1, 0,9 , 0,8 , 0,1 , 0 cm^3 d'une solution de BAEE 0,02 M, ce qui correspond à des pourcentages d'activité allant de zéro à cent. On complète à $2,5 \text{ cm}^3$ avec la solution tampon et l'on procède à la coloration comme précédemment.

V - RESULTATS.

Au niveau du foie, du rein et du pancréas de rats albinos ainsi que sur l'enzyme cristallisée, les diverses lactones étudiées (PC 359, PC 360, PC 343a, PC 343) ne manifestent aucun effet sur l'activité trypsique.

Activité trypsique en μ mole de B A E E hydrolysé par minute
et par gramme de tissu frais ou μ mole d'enzyme cristallisée.

	Témoin	Produit PC 359	Produit A	Produit PC 360	Produit PC 343 a	Produit PC 343
Rein 1/10	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5
Foie 1/10	4	3,9	4	4	4	4
Pancréas 1/500	333	333	333	333	333	333
Trypsine cristallisée (★) 1/50 000	1450	1450	1450	1450	1450	1450

(★) Nous avons choisi pour la trypsine cristallisée le poids moléculaire de 23 800 ainsi que le préconisent CUNNINGHAM (68) et JANSEN (13).

CHAPITRE III

ACTIVITE ADENOSINE TRIPHOSPHATASIQUE

MEMBRANAIRE

Depuis ces dernières années, de nombreux travaux ont montré le rôle déterminant de l'activité ATPasique membranaire dans le transport du sodium et du potassium à travers la cellule (49) (80) (121) (122) (97) (188) (210). Cette enzyme activée par l'association des ions sodium et potassium est fortement inhibée par les glycosides cardiaques tels que l'ouabaine. Cette action fut mise en évidence dans de nombreux tissus provenant d'espèces animales très variées (1) (5) (28) (84) (152) (211) (238).

L'hypothèse émise par REPKE (191) et reprise par WOLFF (243) serait que le groupement carbonyle lactonique de l'ouabaine sert d'accepteur de protons pour former une liaison hydrogène avec l'ATPase de transport.

WEATHERALL (237) ajoute que la saturation de l'anneau lactonique dans les glycosides cardiaques retentit sur le transport des ions de la même manière qu'elle influence l'activité cardiaque.

Pour GLYNN (104) tous les glycosides et toutes les génines inhibant la $(Na^+ + K^+)$ ATPase présentent une lactone insaturée liée au carbone 17. Une perte d'activité totale ou partielle est entraînée par saturation de l'anneau lactonique. Enfin KAHN (141) rapporte que des lactones simples, l'angélicallactone, la butyrolactone et la propiolactone sont capables d'inhiber complètement le transport des

cations au niveau des érythrocytes humains. Toutefois leur activité est très nettement inférieure à celle de l'ouabaine.

C'est l'interférence possible de la fonction lactone sur l'ATPase membranaire qui nous a conduit à tester l'activité de nos produits sur cette enzyme. Nous avons choisi pour la préparation de la solution enzymatique la technique de SKOU (212) et nous avons dosé le phosphate libéré par le réactif de FISKE et SUBBAROW (93) (181) (69).

I - PRINCIPE.

L'ATPase ou ATP phosphohydrolase catalyse la libération de l'orthophosphate terminal à partir de l'adénosine triphosphatate (A. T. P.) par scission de la liaison anhydride phosphorique.

La réaction a lieu selon le schéma suivant :



Le phosphate inorganique libéré est dosé par une estimation photolorimétrique à 650 m μ .

II - REACTIFS.

- Solution d'A. T. P. 0,01 M (sel disodique) dans le tampon histidine 0,06 M.
- A. T. P. — — — — — 0,0623 g
- D. L. Histidine — — — — — 0,0930 g
- Eau distillée q. s. p. 10 cm³

Cette solution à pH 6,8 peut être conservée à -15° C de nombreux mois sans hydrolyse appréciable.

- Tampon histidine 0,03 M à pH 6,8
- Histidine — — — — — 0,465 g
- Eau distillée q. s. p. 100 cm³

On dissout dans cette solution les ions activateurs, Mg²⁺, Na⁺ et K⁺ sous forme de MgCl₂, NaCl et KCl.

- MgCl_2 - - - - - 0,190 g
- NaCl - - - - - 2,34 g
- KCl - - - - - 0,596 g
- tampon histidine 0,03 M q.s.p. 100 cm^3 .

ce qui correspond à des concentrations de 20 mM par litre de MgCl_2 , 400 mM par litre de NaCl et 80 mM par litre de KCl .

- Acide trichloracétique à 15 p. 100
- Solution de Molybdate acide d'ammonium à 5 p. 100 dans H_2SO_4 3 N
 - Molybdate d'ammonium - - - 5 g.
 - H_2SO_4 condensé - - - - - 14,7 g.
 - Eau distillée q.s.p. - - - - - 100 cm^3
- Réactif de FISKE et SUBBAROW
 - Acide 1 amino-2-naphtol-4-sulfonique - - - - 0,2 g
 - Métabisulfite de sodium - - - - - 12 g
 - Sulfite anhydre de sodium - - - - - 1,2 g
 - Eau distillée q.s.p. - - - - - 100 cm^3

III - TECHNIQUE.

A - Préparation de la solution enzymatique.

Les animaux sont tués par décapitation. Le cerveau est rapidement prélevé par section de la boîte crânienne et immédiatement plongé dans une solution glacée contenant 0,25 M de saccharose, 0,03 M d'histidine et 0,005 M d'EDTA disodique à pH 6,8. Il est ensuite découpé en fines parties, puis homogénéisé à l'appareil POTTER-ELVEHJEM dans 10 volumes de la solution précédente. L'homogénat est centrifugé à 0° C à 10 000 g pendant 15 minutes. Le sédiment est écarté ; le surnageant subit une deuxième centrifugation à 20 000 g pendant 1 heure. Après cette centrifugation le sédiment est remis en suspension dans la moitié de son volume d'origine dans une solution contenant 0,25 M de saccharose, 0,03 M d'histidine et 0,001 M d'EDTA disodique. Cette solution est alors de nouveau centrifugée à 20.000 g pendant 30 minutes. Ce dernier sédiment remis en suspension dans 10 cm^3 de la solution précédente constituera la préparation enzymatique définitive.

B - Dosage de la solution enzymatique.

Dans chaque tube on introduit :

- 0,5 cm³ de la solution tampon contenant les ions Mg²⁺, Na⁺, K⁺
- 0,5 cm³ de solution enzymatique.
- 0,5 cm³ d'une solution à 1 p. cent du produit à tester
- 0,5 cm³ de la solution d'ATP

Dans les tubes témoins, on remplace la solution de produit par 0,5 cm³ d'eau distillée.

On met les tubes au bain-marie à 37° C, pendant 10 minutes. On stoppe la réaction par addition rapide de 1 cm³ d'acide trichloracétique. Après centrifugation, on prélève dans chaque tube 1 cm³ de surnageant. A chaque prise d'essai on ajoute 1 cm³ de molybdate d'ammonium en milieu sulfurique, puis 3 cm³ d'eau distillée, 0,5 cm³ de réactif de Fiske et Subbarow et l'on complète à 10 cm³ avec de l'eau distillée. Après cinq minutes, on passe au photolorimètre à 650 mμ.

IV - ETALONNAGE.

La gamme étalon est réalisée en répartissant dans différents tubes : 0, 0,1, 0,2, 0,3 0,9, 1 cm³ d'une solution de KH₂PO₄ à 218 mg/l. On complète à 1 cm³ avec de l'eau distillée, ce qui correspond à des pourcentages d'activité allant de zéro à cent. On procède à la coloration comme précédemment.

V - RESULTATS.

Les composés PC 360 et PC 343 a sont sans effet sur l'activité ATPasique membranaire, seul le produit PC 359 manifeste une légère inhibition, alors que l'ouabaine, dans les mêmes conditions et à la dose de 10⁻⁵ M, inhibe complètement l'activité (Na⁺ + K⁺) ATPasique.

	Témoin	Produit PC 359	Produit PC 360	Produit PC 343 a	Ouabaïne
Cerveau 1/2	0,60	0,50	0,60	0,60	0,05

Activité ATPasique membranaire en μ mole d'ATP
hydrolysé par minute et par gramme de tissu frais.

II - PHARMACOLOGIE

CHAPITRE I

DETERMINATION DE LA DOSE LETHALE 50 DU PC 343 a ET DU PC 360 PAR VOIE INTRA-PERITONEALE CHEZ LA SOURIS

I - GENERALITES.

La méthode employée pour le calcul de la DL 50 est celle décrite par KARBER et BEHRENS (146) (13) (14).

1 - Mode opératoire.

Nous avons opéré sur des lots de 6 souris albinos " Swiss " de 18 à 20 g provenant du même élevage et soumises à un régime préalable identique (Provende U A R et eau fraîche à volonté). Les solutions de PC 343 a et PC 360 sont injectées par voie intra-péritonéale sous forme de solutions aqueuses.

Les doses administrées sont en progression géométrique de raison 2.

2 - Résultats.

Ils sont consignés dans les tableaux ci-joints.

P C 343 a				
Raison 2	Souris 20 g.			
Doses en mg/kg de poids corporel	250	500	1 000	2 000
Nombre d'animaux	6	6	6	6
Nombre de morts en 24 h.	0	0	0	0
Nombre de morts en 48 h.	0	0	0	0
Nombre total de morts	0/6	0/6	0/6	0/6

P C 360					
Raison 2	Souris 20 g				
Doses en mg/kg de poids corporel	250	500	1000	2000	4000
Nombre d'animaux	6	6	6	6	6
Nombre de morts en 24 h	0	0	0	0	0
Nombre de morts en 48 h	0	0	0	0	0
Nombre total de morts	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6

II - CONCLUSIONS.

Les doses de 2 g/kg pour le PC 343 a et de 4 g/kg pour le PC 360 représentent le seuil de solubilité maximal des produits. Il ne nous a donc pas été possible d'administrer des doses supérieures aux souris.

Toutefois nous pouvons constater que ces produits semblent dépourvus de toxicité, puisque des doses aussi élevées que 2 g et 4 g/kg de poids corporel ne provoquent aucune mortalité des animaux.

CHAPITRE II

ETUDE DES EFFETS DU PC 360 SUR LE COMPORTEMENT DES ANIMAUX

L'étude du comportement a été effectuée selon la méthode de CAMPBELL et RICHTER (50) (192). Nous nous sommes inspirés des études sur le comportement faites par BASTIAN (10), HERMANSEN (118) (119), IRWIN (125) (126), NODINE (176) et TURNER (227).

I - ANIMAUX.

Des souris albinos " Swiss " des deux sexes d'un poids voisin de 18 à 20 g.

II - ADMINISTRATION DES MEDICAMENTS.

Ils sont administrés par voie intra-péritonéale en solution dans l'eau distillée à une dose égale au $1/5$ de la DL₅₀ en intra-péritonéale. N'ayant pu déterminer avec précision la DL 50 du PC 360 nous avons utilisé, le produit à la dose de 1 g par kg de poids corporel.

III - OBSERVATIONS.

Elles sont faites le premier jour au temps 0, 5, 15, 30, 60 minutes et 2, 4, 6, 24, 48 heures après l'administration.

IV - EXPERIMENTATION.

Le jour de l'expérimentation, les animaux sont privés de nourriture et d'eau. Les animaux sont pesés.

On injecte la solution de PC 360 par voie intra-péritonéale à la dose de 20 mg pour une souris de 20 g.

Cinq minutes après l'injection, chaque animal est observé pour les signes suivants :

- ptosis
- piloérection
- phénomène de Straub
- diminution ou augmentation de l'activité motrice.

Ensuite chaque animal est observé en dehors de sa boîte en le maintenant d'une main pour les signes suivants :

- salivation
- lacrymation
- mydriase
- myosis

Puis il est placé sur une surface lisse et observé pour les signes suivants :

- pattes arrières écartées
- head-drop
- ataxie
- perte du réflexe de posture (righting reflex)
- test de Haffners

Enfin on lui fait subir différents tests de comportement et en particulier :

- test de la planche à trous
- test de la traction
- test de la cheminée
- test de l'évasion ou " climbing test ".

V - TEST DE COMPORTEMENT.

1 - Test de la planche à trous.

a) Généralités.

L'étude du comportement à l'aide de la planche à trous a été effectuée selon la technique de BOISSIER (26) (25).

b) Principe.

Ce test consiste à mesurer l'activité d'un animal (souris naïve) placé en situation libre sur une planche percée de 16 trous. La souris passe périodiquement la tête dans les trous. On détermine toutes les minutes et cela pendant 5 minutes, le nombre de trous explorés. Ce test permet d'apprécier la curiosité, l'activité exploratrice et éventuellement l'anxiété. Ces effets permettent de suivre la " réaction d'exploration " de l'animal.

c) Expérimentation.

Les souris sont déposées avec douceur une à une au centre de la planche et l'on compte le nombre de fois où la souris plonge la tête dans un des trous. Le nombre de trous explorés est relevé au bout de 1, 2, 3, 4, 5 minutes. Il n'est pas tenu compte des arrêts des animaux devant un trou sans son exploration. Il arrive qu'une souris plonge la tête plusieurs fois de suite dans le même trou, seules sont comptées les explorations séparées par un déplacement net de l'animal. Il n'est pas tenu compte des bords de la planche où d'ailleurs les souris ne restent jamais plus de quelques secondes.

d) Résultats.

Après injection de PC 360 à la dose de 1 g/kg, il a été trouvé les résultats suivants par minute :

Dose en mg/kg I. P.	Nombre de souris	0	5mn	15 mn	30 mn	60 mn	2 h	4 h	6 h	24 h	48 h
Témoins	10	8	7	8	9	8	7	8	8	8	8
PC 360 1 g/kg	10	8	6	3	1	1	3	5	7	8	8

e) Conclusions.

Après injection d'une solution de PC 360 à la dose de 1 g/kg chez la souris, il y a diminution de la " réaction d'exploration " des animaux de 15 minutes à 4 heures après l'administration.

2 - Test de la traction.

a) Généralités.

Le test de la traction a été effectué selon la méthode de COURVOISIER et BOISSIER (24, 65, 66).

b) Principe.

Ce test consiste à suspendre des souris par les pattes antérieures à un fil métallique tendu horizontalement. Tout animal qui ne parvient pas à effectuer un rétablissement qui amène au moins une des pattes postérieures à toucher le fil est considéré comme soumis à une action sédatrice.

c) Technique.

Un fil de fer de 2 mm de diamètre et de 25 cm de longueur est tendu à 30 cm de haut. Les souris étant saisies

par la peau du dos et la queue, on présente le fil à leurs pattes antérieures. L'animal est lâché aussitôt que les pattes ont saisi le fil. L'animal normal effectue son rétablissement immédiatement.

d) Résultats.

Après injection d'une solution de PC 360 à la dose de 1 g/kg, les souris ne peuvent se rétablir que très difficilement. A cette dose notre produit a une action sédatrice.

3 - Test de la cheminée.

a) Généralités.

L'étude du comportement à l'aide du test de la cheminée a été effectué selon la technique de BOISSIER (27).

b) Principe.

Cette technique permet d'apprécier plus particulièrement les effets des médicaments sur les fonctions d'équilibration et le tonus musculaire. Ce test consiste à introduire une souris dans un tube de verre de 30 cm de long et de diamètre choisi en fonction du poids de l'animal. Chaque tube porte une marque située à 20 cm de la base.

c) Technique.

Le tube étant disposé horizontalement, on introduit par l'extrémité du tube la plus rapprochée, une souris, la tête en avant. Lorsque l'animal est parvenu à l'extrémité du tube (poussé éventuellement par une grosse tige de verre), on redresse le tube en position verticale. Immédiatement, la souris tente de remonter à reculons dans le tube.

Le test est dit positif lorsque l'animal atteint la marque tracée sur le tube en moins de 30 secondes.

d) Résultats.

Après administration de PC 360 à la dose de 1 g/kg les souris atteignent la marque tracée en moins de 30 secondes. Le test est donc positif.

4 - Test de l'évasion ou " climbing test "

a) Généralités.

Le test de l'évasion ou climbing test a été effectué selon la méthode de SANDBERG (197) et KNEIP (153).

b) Principe.

Ce test consiste à déposer des séries de 4 souris naïves dans une enceinte dont elles peuvent sortir par un plan incliné grillagé, et à noter le nombre d'animaux évadés au bout d'un temps donné.

e) Résultats.

Après avoir marqué les souris, on les introduit dans l'enceinte et on les laisse aller et venir. On note le temps mis par chaque souris pour sortir une première fois de l'enceinte et ensuite le nombre de sorties chaque minute pendant 5 minutes.

Après administration d'une solution de PC 360 à la dose de 1 g/kg, on constate que les souris restent dans l'enceinte sans sortir. Le test redevient positif au bout de 4 heures.

VI - RESULTATS.

Les souris observées au temps 0, 5, 15, 30 et 60 minutes, 2, 4, 6, 24, 48 heures après l'administration d'une solution de PC 360 ne présentent aucun ptosis, ni phénomène de Straub ni de piloérection.

Il y a par contre, une diminution de l'activité motrice au bout de 5 minutes après l'injection ; on n'observe aucune salivation, lacrymation, aucune mydriase ni myosis.

On constate au bout de 15 minutes que les pattes arrières sont écartées. Les souris présentent un état de somnolence assez net ; elles sont passives, en hypotonie mais la direction de la marche reste contrôlée. Elles gardent le réflexe de posture : la souris placée sur le dos, met moins de 30 secondes pour reprendre sa position normale.

Si on applique un petit clamp artériel à 1 cm de la base de la queue, la souris essaye de mordre dans les 30 secondes qui suivent cette application (Test de Haffners).

Le rythme et l'amplitude respiratoires restent normaux pendant toute la durée d'action du produit. Les selles sont normales. Les animaux ne présentent aucune réaction d'effroi lorsque l'on donne un coup brusque à l'extérieur de la cage.

Seuls les tests de comportement " test de la traction " " planche à trous " et " climbing test " sont négatifs. L'activité exploratrice de la souris est nettement diminuée. A la dose de 1 g/kg nous avons donc constaté un effet sédatif avec état de somnolence.

Nous avons consigné tous nos résultats dans le tableau ci-joint.

CHAPITRE III

RECHERCHE D'UNE ACTIVITE SEDATIVE PAR LE TEST DE LA POTENTIALISATION DU SOMMEIL

La potentialisation du sommeil provoqué par l'hydroxy-2-benzoyl-3 buténolide (82), l'action inhibitrice centrale des sels des acides butyrique et hydroxybutyrique (138) (48), l'effet hypnogène des γ butyrolactone , α chlorobutyrolactone , et α dichlorobutyrolactone (16) nous a conduit à rechercher une activité sédative de nos produits par le test de potentialisation du sommeil selon la méthode de WINTER (240).

Notre étude a porté sur les dérivés PC 359 et PC 360, dérivés qui semblaient induire chez la souris l'état de somnolence le plus net lors des tests de comportement.

I - PRINCIPE.

La potentialisation de la narcose est un des tests de sédation qui permet de mesurer l'influence des médicaments sur la durée du sommeil induite par un hypnotique. Cette méthode est utilisée pour l'étude des médicaments psycholeptiques, c'est-à-dire les hypnotiques, les neuroleptiques ou tranquillisants majeurs, les tranquillisants mineurs.

II - PROTOCOLE EXPERIMENTAL.

1 - Choix des animaux.

Nous avons utilisé des lots de 10 souris albinos " Swiss " d'un poids voisin de 20 g.

2 - Conditions expérimentales.

- Le lot I ou lot témoin reçoit par voie intra-péritonéale vingt minutes avant l'injection de Mébubarbital[★](ou Nembutal), 20 unités insuline par 20 g de poids corporel, d'eau distillée.

- Le lot II reçoit par voie intra-péritonéale, vingt minutes avant l'injection de mébubarbital, 20 unités insuline par 20 g de poids corporel d'une solution de Largactil[★] à 0,08 mg/cm³.

- Le lot III reçoit par voie intra-péritonéale vingt minutes avant l'injection de mébubarbital, 20 unités insuline par 20 g de poids corporel d'une solution de PC 359 à 100 mg/kg.

- Le lot IV reçoit par voie intra-péritonéale vingt minutes avant l'injection de mébubarbital, 20 unités insuline par 20 g de poids corporel d'une solution de PC 360 à 100 mg/kg.

III - RESULTATS.

Le critère du sommeil est la perte du " Righting reflex " (reflexe de redressement).

Les résultats sont consignés dans le tableau suivant :

	Produit	Doses	Voie d'administra- tion	Nombre d'animaux	Moyenne du temps de sommeil en minutes
LOT I	Mébubarbital	35 mg/kg	I. P.	20	20
LOT II	Chlorpromazine Mebubarbital	2 mg/kg 35 mg/kg	I. P.	20	36
LOT III	PC 359 Mebubarbital	100 mg/kg 35 mg/kg	I. P.	20	27
LOT IV	PC 360 Mebubarbital	100 mg/kg 35 mg/kg	I. P.	20	26

IV - CONCLUSION.

L'injection intra-péritonéale d'une solution de PC 359 et PC 360 à la dose de 100 mg/kg provoque un accroissement assez sensible du sommeil induit par un hypnotique.

CHAPITRE IV

RECHERCHE D'UNE ACTIVITE ANTIPYRETIQUE

CHEZ LE COBAYE

Les travaux de DURANTIN (82) sur l'hydroxy-2 benzoyl 3 buténolide effectués dans ce laboratoire, montrent une nette action hypothermisante et antipyrétique de ce composé.

Après avoir noté l'abaissement de température (environ 1°C) provoqué par l'administration des produits PC 359, PC 360, nous nous sommes attachés à en rechercher l'activité antipyrétique.

Cette étude est pratiquée chez le cobaye après hyperthermie consécutive à l'injection de vaccin Propidon selon la méthode préconisée par CHEYMOL (54).

I - TECHNIQUE.

1 - Appareil.

L'appréciation de la température rectale de l'animal d'expérience est effectuée à l'aide d'un thermomètre "ELLAB " type PUC (Electrolaboriet Copenhagen) à thermo-couples à lecture directe. Un galvanomètre à cadre mobile à spot lumineux permet de lire la température avec une précision de $1/10^{\circ}\text{C}$.

2 - Essais.

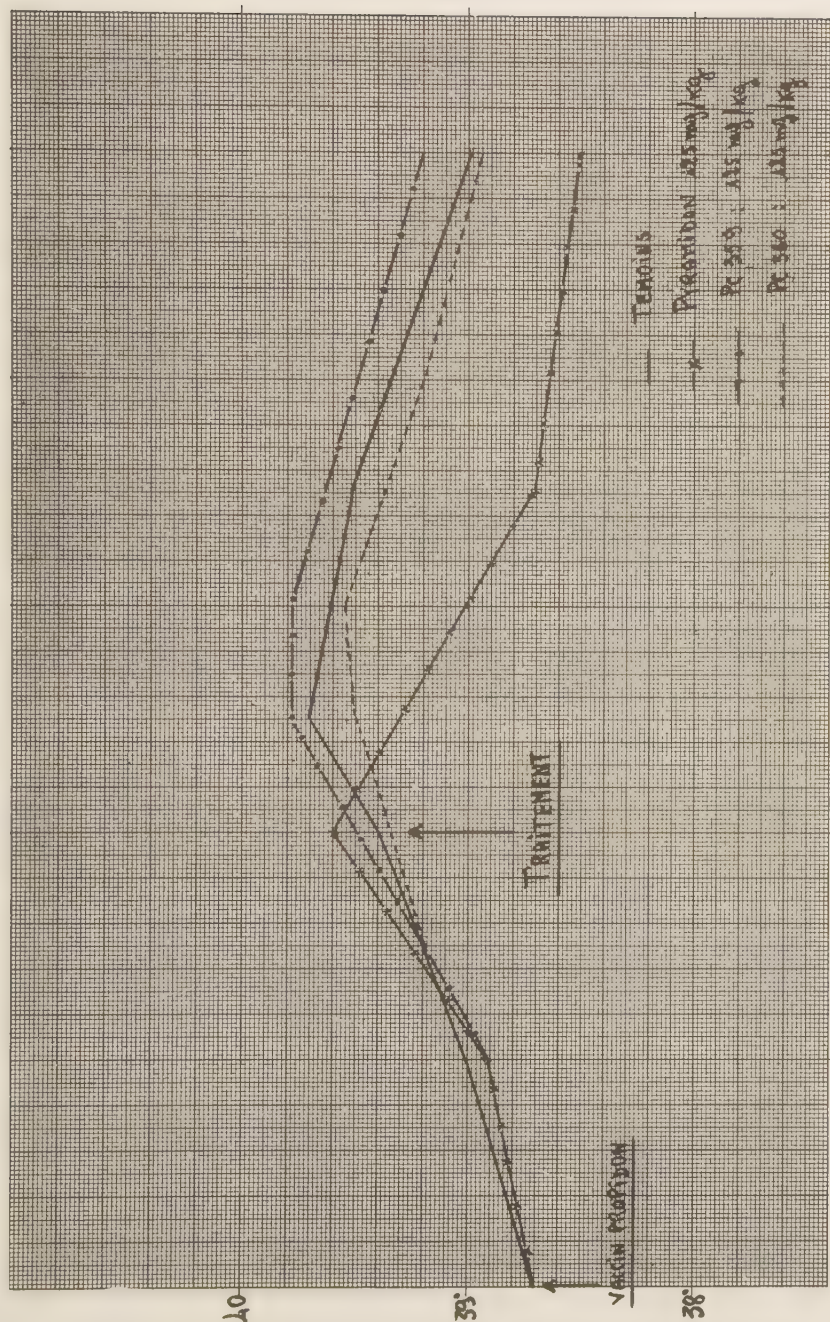
Un groupe homogène de cobayes est maintenu à jeun depuis 24 heures et conservé au laboratoire la nuit précédant l'expérimentation. Après avoir mesuré la température rectale à deux reprises à 15 minutes d'intervalle, il est injecté à chaque animal : 1 cm³/kg de poids corporel de vaccin Propidon par voie intra-péritonéale.

La température est prise toutes les 30 minutes. Deux heures après l'injection de vaccin les animaux sont séparés en 3 groupes :

- 1er groupe : témoins ne recevant aucun traitement
- 2e groupe : recevant la substance à essayer par sonde oesophagienne.
- 3e groupe : recevant la substance de référence par sonde oesophagienne : pyramidon à la dose de 125 mg/kg.

II - RESULTATS.

Notre étude a porté sur les composés (PC 359, PC 343 a). Ils n'ont manifesté aucune activité antipyrétique à la dose de 125 mg/kg. Les résultats sont illustrés par la courbe suivante.



CHAPITRE V

RECHERCHE D'UNE ACTIVITE ANTI-ALGIQUE.

THUILLIER (221) rapporte différentes hypothèses concernant les relations entre la structure chimique et l'activité analgésique. En 1902 VAHLEN (223) attribuait l'activité de la morphine au noyau phénanthrène. Mais après la découverte de la Meperidine en 1939, l'hypothèse de VAHLEN fut abandonnée et SCHAUMANN (202) supposa que le groupement phényl-4 pipéridine est indispensable à l'activité analgésique. La synthèse de la méthadone conduisit SCHAUMANN à modifier son hypothèse en 1949 (203) : " Tout analgésique semblait devoir posséder un noyau aromatique fixé à un atome de carbone quaternaire ". A ce même atome serait substitué un groupement éthylique porteur d'une amine tertiaire.

Le composé PC 360 possède un atome de carbone quaternaire, un noyau aromatique et une amine tertiaire de type pipéridinique. Ce sont ces analogies de structure qui nous ont conduit à rechercher sur ce produit une activité anti-algique. Cette étude a été effectuée selon la méthode de WOOLFE, Mac DONALD (241) et JACOB (128).

TEST DE WOLFE et Mac DONALD

I - PRINCIPE.

La souris est placée dans un récipient porté à la température de + 58° C et on note le temps au bout duquel l'animal réagit à la sensation de brûlure par un lèchement des pattes.

II - PROTOCOLE EXPERIMENTAL.

1 - Choix des animaux.

On choisit des souris albinos " Swiss " adultes d'un poids voisin de 20 g. Les souris qui ne présentent pas une sensibilité convenable doivent être éliminées.

2 - Conditions expérimentales.

On élimine toutes les souris qui ne réagissent pas en moins de 14 secondes. On détermine le temps de réaction : 30 minutes et 15 minutes avant l'administration, puis toutes les 30 minutes.

Les animaux reçoivent en intra-péritonéale la solution de PC 360 à raison de 100 mg par kg de poids corporel.

L'animal sera retiré de la cuve à expérience s'il n'a pas réagi en 20 secondes et est considéré en état d'analgésie totale.

III - RESULTATS.

Ils sont consignés dans le tableau suivant :

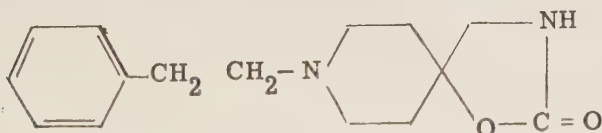
Temps	- 30'	- 15'	+ 30'	+ 1 h	+ 1h30	+ 2 h	+ 2h30	+ 3h
Témoins	8''7	9''3	9''7	9''3	9''	9''4	9''6	9''3
Traités	8''7	9''3	10''2	9''6	9''2	9''6	9''8	9''5

L'administration intra-péritonéale d'une solution de produit PC 360 à la dose de 100 mg/kg ne produit aucune activité anti-algique sensible.

CHAPITRE VI

RECHERCHE D'UNE ACTIVITE ANTI-TUSSIVE

Des recherches récentes sur la synthèse de composés médicamenteux dans lesquels le cycle butanolide comporte un atome d'azote ont abouti à des produits qui engendrent des activités au niveau du système nerveux et périphérique. Le Fenspiride (★) est un antidyspnéique inhibant le bronchospasme à l'histamine, à la sérotonine, à l'acétylcholine.



Il est également anti-tussif et anti-inflammatoire. C'est essentiellement l'analogie de structure entre ce dernier composé et le dérivé de la N benzyl-pipéridine qui nous a conduit à rechercher son action sur le bronchospasme.

Nous avons utilisé la méthode des aérosols tussigènes chez le cobaye selon la technique de CHARLIER (52).

I - PRINCIPE.

Une toux expérimentale est provoquée chez le cobaye par inhalation d'aérosol tussigène d'acide citrique.

(★) Viorespan N.D. Servier.

L'anti-tussif administré 30 minutes avant l'aérosol diminue le nombre de quintes de toux observées en un temps donné. On le compare avec un anti-tussif de référence : la codéïne.

II - TECHNIQUE.

Nous avons utilisé des cobayes d'un poids compris entre 350 et 400 g. On les soumet durant cinq minutes à un aérosol d'acide citrique à 10 p. cent. Quatre ou cinq jours avant, nous avons essayé les cobayes et retenu uniquement les animaux présentant au moins 15 quintes de toux en cinq minutes.

Nous avons réparti ces animaux en plusieurs lots :

- Lot I reçoit la codéïne à raison de 40 mg/kg par voie sous-cutanée.
- Lot II reçoit uniquement du sérum physiologique.
- Lot III reçoit le produit à tester à la dose de 100 mg/kg par voie sous-cutanée.

Tous les animaux sont soumis aux aérosols d'acide citrique 30 minutes après l'administration de l'anti-tussif.

III - RESULTATS.

On fait une moyenne pour chaque lot, le témoin étant amené à 100 p. 100. On exprime l'activité des anti-tussifs en pourcentage de diminution du nombre de quintes par rapport aux témoins.

IV - CONCLUSION.

L'administration du composé PC 360 à raison de 100 mg/kg ne diminue pas le nombre de quintes de toux chez le cobaye soumis à un aérosol d'acide citrique.

CHAPITRE VII

ACTIVITE CHOLERETIQUE.

Le domaine des cholérétiques est un des rares où le pharmacodrame prend sa revanche sur le clinicien, car, ainsi que l'ont souligné CHABROL et CHARONNAT (51) " une constatation fort troublante domine l'étude de cette classe de médicaments : l'impossibilité de graduer les agents de la cholérèse sur le terrain humain ".

Rappelons d'abord que le terme de cholérèse désigne la sécrétion biliaire ; on sait également qu'il existe une cholérèse physiologique, déclenchée par la sécrétine et entretenue par la circulation entéro-hépatique des acides biliaires et une cholérèse médicamenteuse provoquée par les cholérétiques.

Cette distinction a son importance pour l'expression des résultats, car, de toute évidence, pour juger de l'action cholérétique d'un produit, il est indispensable de connaître au préalable la valeur de la cholérèse physiologique ou cholérèse de base de l'animal sur lequel on expérimente.

Quant aux médicaments agissant sur la sécrétion biliaire, on a coutume, depuis BRUGSH et HORSTERS (36) de les classer en deux grands groupes :

- les cholagogues ou cholécystokinétiques qui provoquent l'évacuation de la bile vésiculaire par simple action mécanique, contractile des parois de la vésicule.
- les cholérétiques, d'importance majeure, car ils stimulent la fonction biliaire, par action au sein même de la cellule hépatique.

Dans ce même groupe des cholérétiques, il semble rationnel de différencier avec GREENE et FARRELL (105) :

- Les hydrocholérétiques qui provoquent une exaltation du flux biliaire, mais surtout par dilution, c'est-à-dire par augmentation du véhicule hydrique.
- Les cholérétiques vrais sous l'action desquels non seulement le volume mais également la concentration de la bile éliminée sont augmentés.

Parmi ces derniers, le cyclobutyrol sodique (+) cholérétique puissant doué de toxicité peut être considéré comme la forme ouverte d'une spirolactone.

I - TECHNIQUE D'ETUDE.

A - Choix de l'espèce animale.

Les cholérétiques ont été essayés chez diverses espèces animales, il ressort que les animaux les plus fréquemment utilisés par les expérimentateurs sont : le chien (60 %) le rat (20 %), le lapin (10 %), le chat (6 %), le cobaye (4 %).

KALOW (142) (143) (144) expose les résultats qu'il a obtenus sur l'ensemble de ces cinq espèces animales. Il précise que si " de l'expérience pharmacodynamique d'une substance on doit tirer des conclusions en vue de sa transposition en Clinique Humaine, il semble que les résultats fournis par les omnivores (le Rat) soient les meilleurs, bien que leurs voies biliaires diffèrent de celles de la plupart des mammifères et de l'Homme ".

GIROUX (102) s'attache à suivre les variations du débit en fonction du temps, ceci pendant trois heures, durée normale d'une expérience. Ses recherches ont montré que, seul le Rat avait une sécrétion biliaire stable. De plus ce même auteur rapporte l'extrême sensibilité du Rat vis-à-vis de la substance de référence la plus employée : le déhydrocholate de sodium.

L'ensemble de ces observations nous a conduit à utiliser le rat comme animal d'expérimentation. Le nombre d'animaux, la rapidité d'exécution, la possibilité d'opérer sur des animaux de race constante ont confirmé notre choix.

B - Choix d'une technique.

Nous avons utilisé la méthode de la fistule biliaire temporaire proposée par GIROUX (103) et BOUCARD (29). Cette technique permet d'évaluer l'activité cholérétique éventuelle d'un composé par action directe au sein même de la cellule hépatique.

La fistule temporaire, comme son nom l'indique, est limitée à un laps de temps relativement court (3 à 4 heures). Elle permet d'opérer rapidement et facilement sur un nombre important d'animaux, et ainsi d'essayer différents produits d'une même série.

On reconnaît à l'anesthésie par le carbamate d'éthyle en fistule temporaire une action néfaste sur la sécrétion biliaire qui interviendrait surtout par la diminution de la température corporelle qu'entraîne l'administration de cette substance (145) (31).

Nous avons donc muni la table d'opération d'un dispositif de chauffage permettant d'assurer une température sensiblement constante durant toute la durée de l'expérience.

Il semble, comme le précise BOUCARD (30), inutile dans les conditions opératoires habituelles, de rehydrater l'animal.

II - PROTOCOLE EXPERIMENTAL.

1 - Choix des animaux.

L'étude a été pratiquée sur des rats mâles de même âge, race Sprague Dawley, d'un poids voisin de 350 grammes et soumis à une diète non hydrique de 12 heures.

2 - Choix du matériel.

- Canule à jugulaire
- Cathéter pour trachéotomie
- Cathéter pour fistulisation du cholédoque d'un diamètre intérieur de 0,3 mm et extérieur de 0,7 mm.
- tubes à cholérèse de 2,5 cm³ gradués au 1/50e de cm³.

3 - Réactifs.

- Déhydrocholate de sodium (Dycholium[★] Théraplix).
- Solution à 2 % dans l'eau bidistillée à la dose de 20 mg/kg de poids corporel en injection intra-veineuse.
- Substances à étudier :
- solution dans l'eau bidistillée à la dose de 20 mg/kg de poids corporel en injection intra-veineuse et 50 mg/kg de poids corporel en injection intra-duodénale.

4 - Conditions expérimentales générales.

L'anesthésie est obtenue par injection intra-péritonéale d'une solution à 10 % d'éthyluréthane dans l'eau distillée et à la dose de 1,20 g/kg de poids corporel.

Le rat fixé en décubitus dorsal est épilé dans la région précordiale et dans la région abdominale.

Technique.

- Pose d'une canule dans la veine jugulaire.

La veine jugulaire est mise à nu, puis canulée en direction cardiaque, le bout céphalique étant ligaturé.

- Trachéotomie.

- Fistulisation du canal cholédoque.

On pratique une incision médiane qui permet de découvrir le canal cholédoque.

45 minutes après l'anesthésie, le cholédoque est ligaturé avant sa jonction avec le pancréas. Le cathéter est introduit dans le tiers supérieur du canal cholédoque afin de

recueillir une bile non souillée de suc pancréatique (57). La bile collectée par le cathéter s'écoule dans un tube gradué. La paroi abdominale est recousue et recouverte d'une compresse. Pendant la durée de l'expérimentation l'animal est chauffé afin d'obvier à l'hypothermie consécutive à l'anesthésie.

Mesures.

- 1 - Détermination de la cholérèse de base.

15 minutes après la fistulisation du cholédoque, on mesure le volume écoulé. Les lectures s'effectuent ensuite toutes les 15 minutes pendant une heure.

On envisage uniquement les deux mesures a et b de la dernière demi-heure. Les mesures de débit biliaire sont rapportées à l'heure et au kg de poids corporel.

$$\text{Cholérèse de base} = \frac{2 (a + b) \times 1\,000}{p} \quad p = \text{poids de l'animal.}$$

- 2 - Détermination de la cholérèse après administration du produit.

$$\text{Cholérèse du premier quart d'heure} = \frac{4 \times C \times 1\,000}{p}$$

C = volume écoulé pendant le premier quart d'heure
p = poids de l'animal.

III - RESULTATS.

Nos résultats portent pour chaque produit et pour chaque voie d'administration sur des moyennes de 10 rats. Dans les tableaux I et II, les cholérèses du 1er, 2e, 3e 8e quart d'heure suivant l'administration de produit sont désignées par cholérèse I, II, III, VIII.

Les pourcentages d'augmentation du débit biliaire par rapport au débit de base sont consignés dans les tableaux III et IV dans la figure A qui les illustre.

Nous notons une nette activité cholérétique de tous nos produits administrés par voie intra-veineuse à la dose de 20 mg/kg. Seul le composé PC 359 demeure sans effet. Comparée à l'action cholérétique étalon du déhydrocholate de sodium aux mêmes doses, celles de nos dérivés s'avère beaucoup plus durable. Elle semble en tous points identique à celle du cyclobutyrol sodique.

Par voie intra-duodénale à raison de 50 mg/kg le débit biliaire est doublé au bout de 30 minutes et l'hypercholérèse se prolonge pendant plus de 2 heures. Le composé PC 360 devient inactif par voie digestive, il ne semble pas franchir la barrière intestinale.

IV - CONCLUSIONS.

Nous avons testé l'activité cholérétique de ces produits essentiellement en raison de leur similitude de structure avec le cyclobutyrol sodique (+) qui peut être considéré comme la forme ouverte d'une spirolactone.

Au vu de nos résultats il semble que l'activité soit due au seul cycle lactonique et qu'elle est peu influencée par les substituants fixés sur le carbone spiranique sauf dans le cas du dérivé de la N-méthyl pipéridine (PC 359).

Il serait donc intéressant de tester l'effet cholérétique de butyrolactones plus simples pour vérifier cette hypothèse.

Notons enfin que certains auteurs ont signalé que l'introduction d'un noyau benzénique potentialisait l'activité cholérétique. Ceci semble confirmé par le fait que le dérivé de la N benzyl pipéridine est actif alors que le dérivé méthylé ne l'est pas.

(+) Hebucol N D Logeais.

TABLEAU I

VOIE INTRA-VEINEUSE : 20 mg/kg

CHOLERESE de base	2, 43	1, 86	1, 60	1, 64	1, 90	1, 75
PRODUITS	PC 343a	PC 343	PC 325	PC 360	PC 359	PC 326
CHOLERESE I	4, 11	2, 88	2, 53	2, 66	2, 20	2, 68
CHOLERESE II	3, 52	2, 79	2, 48	2, 34	2, 09	2, 64
CHOLERESE III	3, 23	2, 69	2, 31	2, 18	1, 90	2, 46
CHOLERESE IV	2, 93	2, 60	2, 28	2, 02	1, 81	2, 29
CHOLERESE V	2, 84	2, 58	2, 22	1, 88		2, 00
CHOLERESE VI	2, 70	2, 32	2, 13	1, 79		1, 76
CHOLERESE VII	2, 63	2, 23	1, 86	1, 65		
CHOLERESE VIII	2, 55	2, 04	1, 77	1, 60		

TABLEAU II

VOIE INTRA-DUODENALE
50 mg/kg

CHOLERESE DE BASE	1, 90	1, 70	2, 00	2, 12	1, 88
PRODUITS	PC 343a	PC 343	PC 325	PC 360	PC 326
CHOLERESE I	2, 66	2, 40	2, 88	2, 20	3, 06
CHOLERESE II	4, 05	3, 42	3, 80	2, 10	3, 90
CHOLERESE III	3, 79	3, 23	3, 50	2, 08	3, 51
CHOLERESE IV	3, 31	3, 18	3, 30	2, 11	3, 20
CHOLERESE V	2, 98	2, 92	3, 10	2, 07	2, 94
CHOLERESE VI	2, 73	2, 80	2, 95		2, 73
CHOLERESE VII	2, 32	2, 56	2, 80		2, 49
CHOLERESE VIII	2, 25	2, 30	2, 65		2, 34

TABLEAU III

VOIE INTRA-VEINEUSE : 20 mg/kg

CHOLERESE DE BASE	2, 43	1, 86	1, 60	1, 64	1, 90	1, 75	2, 29	1, 93
PRODUITS	PC 343a	PC 343	PC 325	PC 360	PC 359	PC 326	D	H
Pourc. d'augm. I	69 %	54 %	58 %	62 %	15 %	53 %	66 %	59 %
Pourc. d'augm. II	44 %	50 %	55 %	42 %	10 %	50 %	21 %	47 %
Pourc. d'augm. III	32 %	44 %	44 %	32 %	0	40 %	7 %	45 %
Pourc. d'augm. IV	20 %	39 %	42 %	23 %		30 %	-4 %	38 %
Pourc. d'augm. V	16 %	38 %	38 %	14 %		14 %	-2 %	35 %
Pourc. d'augm. VI	11 %	24 %	33 %	9 %		0	+3 %	25 %
Pourc. d'augm. VII	8 %	19 %	16 %	0			-2 %	21 %
Pourc. d'augm. VIII	4 %	9 %	10 %	-3 %				16 %

D : Déhydrocholate de sodium ou DYCHOLIUM ★

H : Cyclobutyrol sodique ou HEBUCOL ★

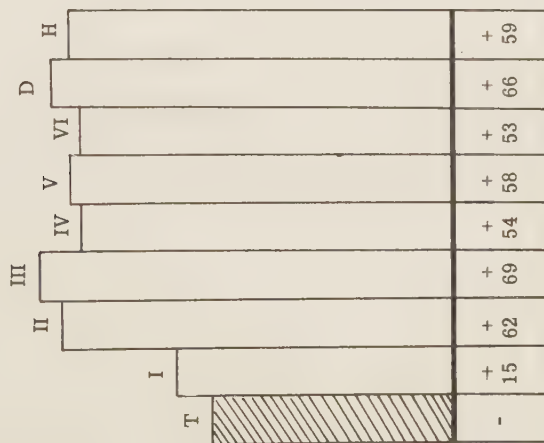
TABLEAU IV

VOIE INTRA-DUODENALE :
50 mg/kg

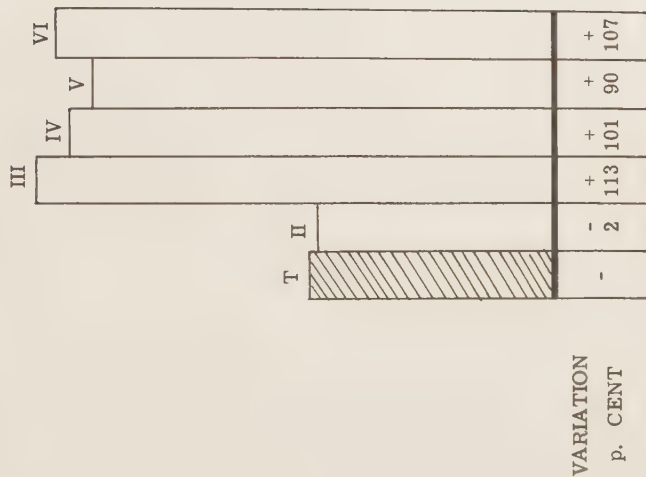
CHOLERESE de BASE	1, 90	1, 70	2, 00	2, 12	1, 88
PRODUITS	PC 343 a	PC 343	PC 325	PC 360	PC 326
Pourc. d'augm. I	40 %	41 %	44 %	2 %	62 %
Pourc. d'augm. II	113 %	101 %	90 %	-2 %	107 %
Pourc. d'augm. III	99 %	90 %	75 %	-3 %	86 %
Pourc. d'augm. IV	74 %	87 %	65 %	-2 %	70 %
Pourc. d'augm. V	56 %	71 %	55 %	-3 %	56 %
Pourc. d'augm. VI	43 %	64 %	48 %		45 %
Pourc. d'augm. VII	22 %	50 %	40 %		32 %
Pourc. d'augm. VIII	18 %	35 %	33 %		24 %

FIGURE V

Pourcentage d'augmentation du débit biliaire
15 minutes après injection I. V. de produit
20 mg/kg



Pourcentage d'augmentation du débit biliaire
30 minutes après injection I. D. de produit
50 mg/kg



T = Témoins ; I : PC 359 ; II : PC 360 ; III : 343a ; IV : PC 343 ; V : PC 325 ; VI : PC 326.

D : Dycholium ; H : Hebucol

CHAPITRE VIII

RECHERCHE D'UNE ACTIVITE CHOLAGOGUE

Les propriétés cholérétiques marquées des diverses spirolactones étudiées nous ont conduit à compléter notre travail par une recherche d'activité cholagogue. De nombreux auteurs étrangers ont travaillé sur le cobaye : HIGGINS (120) MANN et HIGGINS (165), BURGET et BROCKLEHURIST (47), BRUGSH et HORSTERS (36), JUNG et GREENGARD (139), DOUBILET et IVY (78).

Nous avons recherché l'effet propre de nos produits sur la vésicule biliaire isolée de cobaye, maintenue en survie dans du liquide de Tyrode oxygéné et à 39° C, en enregistrant les contractions et les modifications du tonus du cholecyste par la technique de CHIRAY, JUSTIN-BESANCON et DEBRAY (55).

I - TECHNIQUE.

1 - Choix du matériel.

Le montage de ces préparations a nécessité l'emploi d'un bain-marie type Valette (Ets Jouan) pour organes isolés d'animaux homéothermes.

2 - Choix des réactifs.

Liquide de Tyrode.

- Chlorure de sodium	8 g
- Chlorure de potassium	0,2 g
- Chlorure de Calcium	0,2 g
- Chlorure de magnésium	0,1 g
- Glucose	1 g
- Carbonate monosodique	1 g
- Eau distillée q. s. p.	1000 cm ³

3 - Choix des animaux.

Préparation de la vésicule de cobaye.

Un cobaye qu'on prendra de préférence à jeun, car les contractions sont plus nettes que sur l'animal en digestion, est sacrifié par saignée. On fixe une ligature avec un fil très fin, sur le cystique, à sa naissance sur le col de la vésicule. On pratique la section en aval du canal cystique et une cholécystectomie rétrograde, en coupant prudemment aux ciseaux les adhérences qui réunissent le cholecyste au foie. Avec une pince de Pean à irridectomie, on saisit avec précaution le point le plus saillant du fond de la vésicule ; un fil est appliqué au-dessous de la pince, sur la paroi vésiculaire ; une fois le noeud fait on enlève la pince. La vésicule est ainsi comprise entre deux ligatures, l'une sur le cystique, l'autre sur le fond. Il ne reste plus qu'à fixer les deux fils correspondants ; l'un est accroché au fond de la cuve à organes, l'autre est fixé à un myographe. La cuve d'expérimentation est remplie de Tyrode et convenablement aérée; la température est maintenue constante à 39° C par un thermostat.

L'organe reste ainsi plein de bile, et si l'on a soin d'opérer sur l'animal à jeun, la vésicule bien remplie, se trouve, sans préparation spéciale, sous une pression de 4 à 5 centimètres d'eau, pression optima pour obtenir les contractions maximales (78).

II - RESULTATS.

Avec les six produits étudiés (PC 358, PC 360, PC 343 a, PC 343, PC 325, PC 326), aux doses croissantes de 50 à 500 mg par litre de Tyrode, il n'a été enregistré aucune modification du tonus du cholecyste ni aucune variation des contractions spontanées. Les produits n'ont manifesté aucun effet sur l'action contracturante provoquée par le chlorhydrate de pilocarpine.

CHAPITRE IX

RECHERCHE D'UNE ACTIVITE DIURETIQUE

Les spirolactones de la série stéroïdique désignées aussi sous le nom de spironolactones sont des inhibiteurs périphériques de l'aldostérone, stéroïde qui possède l'action la plus intense sur le métabolisme du sodium et du potassium. Administrées à l'animal entier, les spironolactones provoquent une diurèse tout d'abord sodée, puis aqueuse, avec une élimination accrue des chlorures, une diminution de l'élimination du K^+ , des ions H^+ ainsi que de NH_3^+ . Leur mécanisme d'action semble maintenant bien établi ainsi qu'en témoignent les expériences de LIDDLE (161), VANDER (234), et CRABBE (67). Depuis 1956, la famille des spirolactones a fourni des composés actifs par voie buccale et d'activité antialdostérone élevée. Deux composés sont commercialisés en France : la spironolactone (★) et le 11.614 R. P. (★ ★).

D'autre part l'activité cholérétique et hydrocholérétique de certains produits très largement utilisés en clinique, tels que le cyclobutyrol sodique et le déhydrocholate de sodium, semble souvent s'accompagner d'un effet diurétique non négligeable ainsi qu'en témoignent leurs indications thérapeutiques.

C'est cette association, formule spirolactonique et pouvoir cholérétique, qui nous a tout naturellement conduit à rechercher sur le composé PC 343 a une activité diurétique.

(★) Aldactone N. D. Byla

(★★) Phanurane N. D. Spécia.

I - TECHNIQUE.

Nous avons utilisé la méthode de BURN modifiée par LIPSCHITZ (164). Elle consiste à mesurer le pouvoir diurétique d'un composé chez le rat mâle d'un poids compris entre 160 et 260 g.

1 - Protocole expérimental.

Les animaux sont soumis à une diète non hydrique 18 heures avant le début de chaque expérience. Au temps " zéro " chaque animal témoin reçoit à l'aide d'une sonde oesophagienne, une dose de sérum physiologique correspondant avec exactitude à 2,5 ml pour 100 g de poids corporel.

Les animaux traités reçoivent au même moment la substance à essayer en solution dans le liquide d'hydratation à raison de 2,5 cm³ par 100 g de poids corporel.

Les animaux sont placés par groupe de 3 dans des cages à métabolisme à paroi lisse, les urines étant recueillies dans un tube gradué au moyen d'un entonnoir en matière plastique à paroi lisse et très oblique. L'eau et les aliments sont supprimés pendant la durée de l'expérience, les urines étant collectées pendant les 5 heures suivant l'administration du produit. La vessie de l'animal est vidée par pression externe au début et à la fin de chaque expérience.

II - RESULTATS.

Le produit PC 343 a a été essayé sur 27 rats mâles à la dose de 50 et 100 mg par kg de poids corporel. Il n'a été constaté aucune augmentation du volume urinaire. La vitesse d'élimination de la surcharge hydrique n'a subi aucune modification.

CONCLUSIONS GENERALES.

Notre travail se présente comme une tentative pour élargir nos connaissances enzymologiques et pharmacodynamiques, sur une famille de composés peu étudiés, les acides spirolactone carboxyliques.

Qu'il nous soit permis de rappeler combien l'étroite collaboration technique des laboratoires de Chimie Biologique et Pharmacodynamie de M. le Professeur BASTIDE et de Pharmacie chimique de M. le professeur TRONCHE a facilité la réalisation de ce travail.

Dans une première étude bibliographique nous avons repris les diverses méthodes chimiques permettant d'accéder aux acides spirolactone carboxyliques. Nous avons ensuite rappelé brièvement l'intérêt biologique et pharmacodynamique des dérivés lactoniques.

Nos recherches personnelles ont été guidées par des études précédentes mettant en relation certains éléments structuraux de nos composés et la configuration moléculaire de quelques enzymes. Nous avons ainsi exploré l'activité chymotrypsique et trypsique. Les résultats se sont montrés décevants et d'une interprétation difficile. L'inefficacité de nos dérivés sur l'activité chymotrypsique du pancréas de rat confirmée par notre étude sur l'enzyme cristallisée ne nous a pas permis de vérifier avec Tobias l'hypothèse selon laquelle l'alphachymotrypsine est capable de provoquer l'ouverture des cycles lactoniques.

L'inhibition de l'adénosine triphosphatase membranaire par les cardénolides et glycosides cardiaques nous a conduit à envisager l'interférence possible de nos composés sur cette enzyme.

Il semble bien, au vu de nos résultats, que l'anneau lactonique ne puisse induire une telle activité qu'associé au noyau cyclopentanophénanthrène.

Les essais pharmacologiques ont montré la faible toxicité des lactones dérivées de la cyclohexanone et de la N-Benzyl piperidone. Des différents tests de comportement nous avons pu isoler une activité sédatrice de ce dernier. La confirmation en fut donnée par son effet potentialisateur du sommeil. Ce même composé n'a toutefois manifesté aucune activité antitussive, ni antalgique.

La recherche de propriétés cholérétiques a par contre fourni de meilleurs résultats. Elle a permis en effet de montrer l'intense activité de tous les composés étudiés ; seul le dérivé de la N-méthyl piperidone est demeuré inactif. Comparée à l'hypercholérèse étalon du déhydrocholate de sodium, celle de nos produits s'avère beaucoup plus durable.

Cholérétiques, dénués d'effet cholagogue et diurétique, ces composés semblent agir au sein même de la cellule hépatique. Notons également que l'activité engendrée par le cycle lactonique n'est que peu influencée par les substituants fixés sur le carbone spiranique.

En définitive, nous espérons avoir apporté quelques précisions, fussent-elles assez modestes, qui contribueront peut-être à une meilleure connaissance d'une série d'acides spirolactone carboxyliques.

Vu, le Président de Thèse

Le 11 Mars 1971

P. BASTIDE

Vu, et Permis d'Imprimer

n° 1/1971/Ph

Le 15 Mars 1971

Le Doyen

M. COULET

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - ALDRIDGE W.N. - ATPase in the microsomal fraction from rat brain. *Biochem. J.*, 1962, 83, p. 527.
- 2 - ANDRAUD G., COUQUELET J., DOREL M., TRONCHE P. - *Ann. Biol. Clin.*, 1966, 24, p. 469.
- 3 - ANDRAUD G., CUVELIER R., TRONCHE P., COUQUELET J. - *C.R. Soc. Biol.*, 1964, 158, p. 2341.
- 4 - ANDRAUD G., TRONCHE P., COUQUELET J., DOREL M. - *C.R. Soc. Biol.*, 1965, 159, p. 686.
- 5 - AUDITORE J. V. - ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$) activated g-strophantin sensitive ATPase in cardiac muscle. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, N. Y., 1962, 110, p. 595.
- 6 - BAER H. - *J. Biol. Chem.*, 1946, 162, p. 65.
- 7 - BAMANN E., SCHMELLER M. - *Z. Physiol. Chem.*, 1931, 194, p. 14.
- 8 - BAMANN E., SCHWEIZER E., SCHMELLER M. - *Z. Physiol. Chem.*, 1933, 222, p. 121.
- 9 - BARMANT E. - *Enzyme Handbook*, Springer Verlag Ed. Berlin, 1969, 2, p. 515.
- 10 - BASTIAN J. W. - *Arch. intern. Pharmacodyn.*, 1961, 133, p. 347-364.
- 11 - BASTIDE P., BAUDON J., MEUNIER S., DASTUGUE G. - *Ann. Biol. Clin.*, 1963, 21, p. 265.
- 12 - BASTIDE P., COUQUELET Joele, COUQUELET Jacques - *C.R. Soc. Biol.*, 1969, 166, p. 1149.
- 13 - BEHRENS B. - *Arch. F. Path. u. Pharm.*, 1929, 140, p. 237.
- 14 - BEHRENS B., KARBER G. - *Arch. Exp. Path. u. Pharm.*, 1935, 147, p. 379.

- 15 - BENDA P., DESHAIES G., PERLES R., DESHAIES-PERLES S. - Ann. Med. Fr., 1960, 2, p. 770.
- 16 - BENDA P., PERLES R. - C.R. Acad. Sci. Paris, 1960, 251, p. 1312.
- 17 - BENDER M.L., CLEMENT G.E. - Biochem Biophys. Res. Commun., 1963, 12, p. 339.
- 18 - BENDER M.L., TURNQUEST B.W. - J. Amer. chem. Soc., 1957, 79, p. 1652.
- 19 - BESSMAN S.P., FISHBEIN W.N. - Nature, 1963, 200, p. 1207.
- 20 - BESSMAN S.P., SKOLNIK S.J. - Science, 1964, 143, p. 1045.
- 21 - BISAGNI E., MARQUET J.P., LOUISFERT J.A. - Bull. Soc. Chim. Fr., 1968, p. 637.
- 22 - BOAS F., STENDE R., - Biochem. Z., 1935, 279, p. 417.
- 23 - BOBRANSKI B., SEDZIMIRSKA B. - Arch. Immunol. Ther. Exp., 1967, 15, p. 435.
- 24 - BOISSIER J.R., SIMON P. - Thérapie, 15, p. 1170.
- 25 - BOISSIER J.R., SIMON P. - Arch. Int. Pharmacodyn., 1964, 147, p. 372.
- 26 - BOISSIER J.R., SIMON P., LWOFF J.M. - Thérapie 1964, 19, p. 571-583.
- 27 - BOISSIER J.R., TARDY J. et DIVERRES J.L. - Med. Exp., 1960, 3, p. 81-84.
- 28 - BONTING S.L., CARAVAGGIO L.L. - Na⁺ + K⁺ activated ATPase in the squid giant axon. Nature, Lond., 1962, 194, p. 1180.
- 29 - BOUCARD M. - La fistule biliaire chez l'animal. Thèse Doct. Pharm., Montpellier, 1957.
- 30 - BOUCARD M., ABELA R. - La fistule biliaire chez le rat. Essai de stabilisation du débit. Bull. Soc. Pharm., Bordeaux, 1963, 102, p. 99.
- 31 - BOUCARD M., NEGRE A. - Regulation thermique et débit biliaire. Thérapie, 1964 : XIX, p. 431-439.
- 32 - BOYER J.B. - Thèse de Doctorat d'Etat en Pharmacie, Clermont-Ferrand, avril 1970.

- 33 - Brevet français n° 1 494 204, Hommel Aktiengesellschaft, 1967.
- 34 - BRODIE A. F., LIPMANN F. - J. Biol. Chem., 1955, 212, p. 677.
- 35 - BROWN M. S. - J. Lab. Clin. Med., 1960, 55, n° 4, p. 616-624.
- 36 - BRUGSH T. H., HORSTERS H. - Cholere und Cholere tica, ein Beitrag zur Physiologie der Galle. Z. ges. exp. Med., 1923, 38, p. 367-397.
- 37 - BRUGSH, HORSTERS - Arch. of Exp. Path. u. Pharmak. 1926, 118, p. 267.
- 38 - BRUCE T. C. - J. Amer. Chem. Soc., 1959, 81, p. 5444.
- 39 - BRUCE T. C., SCHMIR G. L. - J. Amer. Chem. Soc., 1957, 79, p. 1663.
- 40 - B. S. M. - Clin. Byla n° 3925 M, 1966.
- 41 - B. S. M. Etat français n° 7 463 M, 1968.
- 42 - B. S. M. Roussel UCLAF, n° 5 422, 1967.
- 43 - B. S. M. Sandoz S. A., n° 5 151 M, 1965.
- 44 - B. S. M. Searle and Co, n° 7 120 M, 1965.
- 45 - BUBLITZ C., LEHNINGER A. L. - Biochem. Biophys. Acta., 1961, 47, p. 228.
- 46 - BUBLITZ C., LEHNINGER A. L. - Methods in Enzymology, 1963, 6, p. 337.
- 47 - BURGET, BROCKLEHURIST - Amer. J. Physiol., 1927, 83, p. 578.
- 48 - CAHN J., ALANO J., BAMBERGER I., GEORGES G., HAUSER F., HELBECQUE C., HEROLD M., KABACOFF O. - Rev. Agress., 1960, 1, p. 605.
- 49 - CALDWELL P. C., KEYNES R. D. - The effects of injecting " energy rich " phosphate compounds on the active transport of ions in the giant axon of Loligo. J. Physiol. , 1960, 152, p. 561.
- 50 - CAMPBELL Dag., E. S., RICHTER W. - Acta Pharmacol. et Toxicol., 1967, 25, p. 345-363.

- 51 - CHABROL E., CHARONNAT R. - Le problème de la cholérèse. Ses difficultés cliniques et expérimentales. Journées Thérapeutiques de Paris, 1955, p. 295-336.
- 52 - CHARLIER R., PROST M., BINON F., DELTOUR G. - Arch. int. Pharmacol. Therap., 1961, 134, p. 306.
- 53 - CHEN K.K., ELDERFIELD R.C. - J. Pharm. Exp. Therap., 1942, 76, p. 81.
- 54 - CHEYMOL J., LEVASSORT C.H. - Ann. Pharm. Fr., 1953, 13, p. 387.
- 55 - CHIRAY M., JUSTIN-BESANCON L., DEBRAY C.H. - La Revue du Foie, 1943, 2, p. 5.
- 56 - COHEN J.A., OOSTER BAAN R.A., WARRINGA M.G.P., JANSZ H.Z. - Disc. Farad. Soc., 1955, 20, p. 114.
- 57 - COLWELL A.R. - Am. J. Physiol., 1951, 164, p. 812.
- 58 - CONCHIE J. - Biochem. J., 1954, 58, p. 552.
- 59 - CONCHIE J. - Biochem. J., 1957, 65, p. 389.
- 60 - CORDONNIER D. - Vie Médicale, 1964, 45, p. 127.
- 61 - CORNFORTH, HUGHES, LIONS - J. Proc. Roy. Soc. N. S. Wales, 1939, 72, p. 228.
- 62 - COSMIDES G.J., MIYA T.S., CARR C.J. - J. Pharm. Exp. Ther., 1956, 118, p. 286.
- 63 - COUQUELET Jacques - Thèse de Doctorat en Pharmacie d'Etat, Clermont-Ferrand, mars 1967.
- 64 - COUQUELET Joële - Thèse de Doctorat en Pharmacie d'Etat, Clermont-Ferrand, juillet 1970.
- 65 - COURVOISIER S. - J. Clin. exp. Psychopath., 1956, 17, p. 25.
- 66 - COURVOISIER S., DUCROT R., JULOU L. - Psychotropic Drugs, Milan, 1957, Elsevier, Ed., p. 373.
- 67 - CRABBE J. - Decreased effectiveness of aldosterone on active sodium transport by the isolated toad bladder in the presence of other steroids. Acta Endocrinol., 1964, 47, p. 419.
- 68 - CUNNINGHAM L.W. - J. Biol. Chem., 1954, 211, p. 13.

- 69 - DASTUGUE G., BAUDON J., BASTIDE P., REBIERE J. P. - Trav. Soc. Pharm. Montpellier, 1960, 20, p. 249.
- 70 - DAWSON F. W., JANSENN R. F., HOFFMAN R. K. - Appl. Microb., 1960, 8, p. 39.
- 71 - DECKER F., LYNEN F. - 3e Congrès intern. Biochimie., Vaillant Ed., Liège, 1955, p. 36.
- 72 - DICKENS F. - Brit. Med. Bull., 1964, 20, p. 96.
- 73 - DICKENS F., JONES H. E. H. - Brit. J. Cancer, 1965, 19, p. 392.
- 74 - DICKENS F., JONES H. E. H., WAINFORTH H. B. - Brit. J. Cancer, 1966, 20, p. 134.
- 75 - DICKENS F., JONES H. E. H., WILLIAMSON D. H. - A.R. Brit. Emp. Cancer Campgn., 1956, 34, p. 100.
- 76 - DIXON S., WIGGINS L. F. - J. Chem. Soc., 1954, p. 594.
- 77 - DOEPP W., BERSCH H. W. - Die Pharm., 1950, 5, p. 603.
- 78 - DOUBILET, IVY - Réponse du muscle lisse de la vésicule biliaire à des pressions intérieures variées et à la cholecystokinine. Amer. J. Physiol., 1938, 124, p. 378.
- 79 - DULOU R., WILKAS M., PFAU M. - Compt. Rend., 1959, 249, p. 429.
- 80 - DUNHAM E. T., GLYNN I. M. - ATPase activity and the active movements of alcalin metal ions. J. Physiol., 1961, 156, p. 274.
- 81 - DUQUENOIS P., GREIB E. - C.R. Acad. Sci., Paris, 1953, 237, p. 1354.
- 82 - DURANTIN G. - Publication en cours.
- 83 - ELLIOT M. - J. Chem. Soc., 1956, p. 2231.
- 84 - EMMELOT P., BOS C. J. - ATPase in the cell-membrane fraction from rat liver. Biochem. Biophys. Acta., 1962, 48, p. 807.
- 85 - EISENBERG F. Jr., FIELD J. B. - J. Biol. Chem., 1956, 222, p. 293.
- 86 - EZAKI S. - J. Biochem. (Tokyo), 1940, 32, p. 107.
- 87 - FEDORCHUK M., Dissert. Abst., 1962, 22, p. 3418.

- 88 - FINDLAY J., LEVUY G. A., MARSCH C. A. - Biochem J., 1958, 69, p. 467.
- 89 - FISHBEIN L., FALK H. L. - Chromatographic reviews, 1969, 11, p. 415.
- 90 - FISHBEIN W. N., BESSMAN S. P. - J. Biol. Chem., 1964, 239, p. 357.
- 91 - FISHBEIN W. N., BESSMAN S. P. - J. Biol. Chem., 1966, 241, p. 4835.
- 92 - FISHBEIN W. N., BESSMAN S. P. - J. Biol. Chem., 1966; 241, p. 4842.
- 93 - FISKE CH., SUBBAROW Y. - J. Biol. Chem., 1925, 66, p. 375.
- 94 - GASTAMBIDE B., GASTAMBIDE M. - Bull. Soc. Chim. Fr., 1956, p. 1203.
- 95 - GASTAMBIDE B., GASTAMBIDE M. - Fr. 1 121 528, 1956.
- 96 - GASTAMBIDE-ODIER M., CARNERO P., CHEVALLIER J., GASTAMBIDE B., LAROCHE J. M., COTTARD A. - Bull. Soc. Chim. Fr., 1963, p. 1777.
- 97 - CARDOS G. - Akkumulation des Kaliumionen durch menschliche Blutkörperchen, Acta Physiol. Jung., 1954, 6, P. 191.
- 98 - GEIGER W. B., CONN J. E. - J. Am. Chem. Soc., 1945, 67, p. 112.
- 99 - GIARMAN N. J., ROTH R. H. - Science, 1964, 145, p. 583.
- 100 - GIARMAN N. J., SCHMIDT K. F. - Brit. J. Pharm. and Chemotherp., 1963, 20, p. 563.
- 101 - GIROUD J. P., SCHMITT H. - Therapie, 1968, 23, p. 307.
- 102 - GIROUX J., BEAULATON I. S., BOUCARD M. - Choix de l'espèce animale pour l'étude du débit biliaire en fistule temporaire. Trav. Soc. Pharm. Montpellier, 1956, 16, p. 24.
- 103 - GIROUX J., BOUCARD M., BEAULATON J. - Etude expérimentale d'un cholérétique : le débit biliaire. Journées Pharmaceutiques Françaises, Paris, 1956.
- 104 - GLYNN I. M. - Pharmacol. Rev., 1964, 16.
- 105 - GREENE C. H., FARRELL E., LIVER and BILIARY TRACT - Arch. intern. Med., 1940, 65, p. 847-869.

- 106 - GRIGNARD V. - Traité de chimie organique, Masson Ed., Paris, 1945, 11 (1), p. 89.
- 107 - GRUMBACH A., SCHMIDT H., BENEZE W. - Experientia Basel, 1952, 8, p. 224.
- 108 - GUTFREUND H. - Disc. Farad. Soc., 1955, 20, p. 167.
- 109 - GUTFREUND H., HAMMOND B. R. - Biochem. J., 1958, 73, p. 1272.
- 110 - HACKLEY B. E., STOLBERG M., WAGNER-JAUREGG T. - J. Amer. Chem. Soc., 1955, 77, p. 3651.
- 111 - HANO J. - Conf. Fac. Pharm. Montpellier, 5 novembre 1968.
- 112 - HANO J., SIEROSLWSKA H., SYPNIEWSKA M., CZARNECKI R. - Dissert. Pharm. Pharmacol., 1967, 19, p. 321.
- 113 - HARDMAN J. K., STADTMAN T. C. - J. Biol. Chem., 1963, 238, p. 2081.
- 114 - HARTLEY B. S., KILBY B. A. - Biochem. J., 1952, 60, p. 672.
- 115 - HAWORTH, WOODCOCK - J. Chem. Soc., 1938, p. 1985.
- 116 - HAYNES L. J. - Quart. Rev. Chem. Soc. London, 1948, 2, p. 46.
- 117 - HAZARD J., KLEINKNECHT D. - Thérapie, 1967, 22, p. 9.
- 118 - HERMANSEN K., Second Meeting of Biochemistry Medical Chemistry, Pharmacology and Physiology, Abo, 1959.
- 119 - HERMANSEN K. - Acta pharmacol. et Toxicol., 1960, 17, p. 277-287.
- 120 - HIGGINS - Amer. J. Physiol., 1926, 78, p. 339.
- 121 - HOFFMAN J. F. - The link between metabolism and the active transport of Na in human red cell ghosts. Fed. Proc., 1960, 19, p. 127.
- 122 - HOFFMAN J. F. - The active transport of Na by ghosts of human red blood cells. J. Gen. Physiol., 1962, 45, p. 837.
- 123 - HORIKOSHI K. - J. Biochem. (Tokyo), 1942, 35, p. 39.
- 124 - HOSEKI S., KOTAVE M., HAYASI K. - Cités par LEBEAU P. et JANOT M. M., traité de Pharmacie chimique, Masson Ed., Paris, 1955-1956, p. 1155.

- 125 - IRWIN S. - Multidimensional Screening Evaluative Procedures. Lecture presented at the Gordon Research conference on medicinal chemistry, New-London, N. H., 1959.
- 126 - IRWIN S. - Drug Screening and evaluative procedure, Sciences, 1962, 136, p. 123-128.
- 127 - ITO et coll. - Cités par LEBEAU et JANOT, Traité de Pharmacie Chimique, Masson Ed., Paris, 1955-1956, p. 944.
- 128 - JACOB J., BLOZOVSKI M., ECHIMARD-GARIN P. - Thérapie, 1958, 13, p. 17-29.
- 129 - JACOBS W. A. - J. Biol. Chem., 1930, 88, p. 519.
- 130 - JANDORF B. J., MICHEL H. O., SCHAFFER N. K., EGAN R., SUMMERSON W. H., Discussions Faraday Soc., 1955, 20, p. 134.
- 131 - JANSEN E. F., BALLS A. K. - J. Biol. Chem., 1952, 194, p. 721.
- 132 - JANSEN E. F., NUTTING M. D. F., JANG R., BALLS A. K. - J. Biol. Chem., 1949, 179, p. 189.
- 133 - JEFFERY D., FRY A. - J. Org. Chem., 1957, 22, p. 735.
- 134 - JOHNSON W. S., DAUB G. M. - Organic Reaction, John Wiley and Sons Ed., New-York, 1951, 6, p. 27.
- 135 - JOHNSON W. S., DAVID C. E., HUNT R. H., STORK G. - J. Am. Chem. Soc., 1948, 70, p. 3021.
- 136 - JOHNSON W. S., JOHNSON N. C. E., PETERSEN J. W. - J. Am. Chem. Soc., 1945, 67, p. 1360.
- 137 - JOHNSON W. S., PETERSEN J. W., SCHNEIDER W. P. - J. Am. Chem. Soc., 1947, 69, p. 74.
- 138 - JOVANY J. M., GERARD J., BROUSSOLLE B., REYNIER M., ORSETTI A., VERMUTH C., BARON C. - Etude des sels des acides butyriques et hydroxybutyriques. Aggressologie 1960, 1, p. 417.
- 139 - JUNG, GREENGAND - Réponse de la vésicule biliaire isolée à la cholecystokinine. Amer. J. Physiol., 1933, 103, p. 174.

- 140 - KABACOFF B. L., UNHEY M., WOHLMANN A., AVAKIAN S. - Sensitive and reproducible assay method for chymotrypsin. J. Pharm. Sc., 1963, 52, p. 1188-1190.
- 141 - KAHN J. B., J. R., ACHESON G. H. - Effects of cardiac glycosids and other lactones, and of certain other compounds on cation transfer in human erythrocytes. J. Pharmacol., 1955, 115, p. 305.
- 142 - KALOW W. - Archiv. exp. Path. U. Pharmak., 1949, 206, p. 35.
- 143 - KALOW W. - Archiv. exp. Path. U. Pharmak., 1949, 206, p. 43.
- 144 - KALOW W. - Arch. exp. Path. U. Pharmak., 1949, 207, p. 696.
- 145 - KALOW W. - Die Narkotisierte ratte als poikilotermes studien objekt. Arch. Exp. Path. U. Pharmak., 1950, 210, p. 336.
- 146 - KARBER G. - Arch. Exp. Path. U. Pharmak., 1931, 162, p. 480.
- 147 - KATO M., HAYASHI Y., MIWA T., SAKAN T. - Nippon Kogaku Zasshi, 1964, 85, p. 223.
- 148 - KATSUTA C., SUGIYAMA N. - Bull. Chem. Soc. Jap., 1962, 35, p. 1194.
- 149 - KAWAMOTO T., OGURA I. - J. Chem. Soc. Jap., Pure chem. Sect., 1951, 72, p. 743.
- 150 - KAWAMOTO T., OGURA I. - J. Chem. Soc. Jap., Pure chem. Sect., 1952, 73, p. 726.
- 151 - KELLY R. B., DANIELS E. G., SPAULDING L. B. - J. Med. Chem., 1965, 8, p. 547.
- 152 - KINSOLVING C. R., POST R. L., BEAVER D. L. - Na^+ + K^+ transport ATPase activity in Kidney. Biochem. Biophys. Acta., 1963, 62, p. 85.
- 153 - KNEIP P. - Arch. int. Pharmacodyn., 1960, 126, p. 238-245.
- 154 - LACASSAGNE A., BUU-HOI N. P., ZAJDELA F., JACQUIGMON P., MANGANE M. - Science, 1967, 158, p. 387.
- 155 - LADD E. C., PAXTON H. W. - U.S. Patent n° 2 598-803.

- 156 - LEVUY G. A. - Biochem J., 1952, 52, p. 464.
- 157 - LEVUY G. A., CONCHIE J. - Methods in Enzymology, 1966, 8, p. 571.
- 158 - LEVUY G. A., HAY A. J., CONCHIE J. - Biochem. J., 1964, 91, p. 378.
- 159 - LEVUY G. A., Mac ALLAN A. - Biochem J., 1963, 87, p. 206.
- 160 - LEVUY G. A., Mac ALLAN A., HAY A. J. - Biochem. J., 1962, 82, p. 225.
- 161 - LIDDLE G. W. - Specific and non specific inhibition of mineralocorticoid activity. Metabolism, 1961, 10, p. 1021.
- 162 - LINSTED, RYDON - J. Chem. Soc., 1933, p. 580.
- 163 - LITTLE J. E., JOHNSTONE D. B. - Arch. Biochem., 1951, 30, p. 445.
- 164 - LIPSCHITZ W. L. - J. Pharm. Exp. Ther., 1943, 73, p. 97.
- 164 bis - Mac DONALD A. D., WOOLFE G., BERGEL F., MORRISON A. L., RINDERKNECHT H., - Brit. J. Pharmacol., 1964, 1, p. 4.
- 165 - MANN, HIGGINS - Vidage de la vésicule biliaire et mécanisme du choledoque chez le cobaye. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1926, 24, p. 931.
- 166 - MAO J. C. H., WIEGAND R. G. - Biochem. Biophys. Acta, 1968, 157, p. 404.
- 167 - MARCOLLET M., BASTIDE P. - J. de Pharmacologie, 1970, 1, p. 53.
- 168 - MARSH C. A., LEVUY G. A. - Biochem. J., 1958, 68, p. 610.
- 169 - MARUEL - J. Am. Chem. Soc., 1928, 51, p. 349.
- 170 - MATSUI M., OHNO T., KITAMURA S., TOYAO M. - Bull. Chem. Soc. Jap., 1952, 25, p. 210.
- 171 - MIKAILOV B. M. - J. Gen. Chem. U S S R, 1951, 21, p. 395.
- 172 - MIROCHA C. J., CHRISTENSEN C. M., NELSON G. H. - Appl. Microb., 1969, 17, p. 482.
- 173 - MORITA Y. - J. Biochem. (Tokyo), 1956, 43, p. 7.

- 174 - MOUNTER L.A., SHIPLEY B.A., MOUNTER M.A. - J. Biol. Chem., 1963, 238, p. 1979.
- 175 - NELSON W.L., NELSON K.F. - J. Pharm. Sci., 1969, 58, p. 7.
- 176 - NODINE J., SIEGLER P. - Animal and clinical Pharmacologic technique in drug evaluation, 1966, 1, p. 36.
- 177 - NORMANT H., NORMANT J.F. - Chimie organique - Masson Ed., Paris, 1968, p. 378.
- 178 - PERLES R., COURTOIS J.E. - Traité de Biochimie générale, Masson Ed., Paris, 1964, 2, p. 428.
- 179 - PERLMAN D., HOUC T. - Appl. Microb., 1969, 18, p. 272.
- 180 - PELOUZE - C.R. Acad. Sci., 1844, 19, p. 1219.
- 181 - PERRY S.V. - Methods in Enzymology, 1955, 2, p. 582.
- 182 - PESEZ M., POIRIER P., BARTOS J. - Pratique de l'analyse organique colorimétrique. Masson Ed., Paris, 1966, p. 166.
- 183 - PHILIPS D.D., JOHNSON A.W. - J. Am. Chem. Soc., 1955, 77, p. 5977.
- 184 - PILET P.E. - Les phytohormones de croissance, Masson Ed., Paris, 1961, p. 360, 366, 376, 396.
- 185 - PISKOV V.B. - Zhur. Obshechi. Khim., 1962, 32, p. 2046.
- 186 - PITTS J.N. Jr., LETSINGER R.L., TAYLOR R.P., PATTERSON J.M., RECKTENWALD G., MARTIN R.B. - J. Am. Chem. Soc., 1959, 81, p. 1068.
- 187 - PLIENINGER H., FRISCHKORN K. - Chem. Commun., 1968, 12, p. 661.
- 188 - POST R.L., MERRITT C.R., KINSOLVING C.R., ALBRIGHT C.D. - Membrane ATPase as a participant in the active transport of sodium and potassium in the human erythrocyte, J. Biol. Chem., 1960, 235, p. 1796.
- 189 - RAO Y.S. - Chem. Rev., 1964, 64, p. 354.
- 190 - Règles de nomenclature pour la chimie organique, adaptation française, Société Chimique de France, 1968, p. 202.

- 191 - REPKE K. - Drugs and Enzymes, Pergamon Press, Oxford, 1965, p. 65.
- 192 - RICHTER W., CAMPBELL - Mect. of Pharmacology, 1962.
- 193 - ROTH H. - Mikrochim. Acta, 1958, 6, p. 766.
- 194 - ROTH R.H., GIARMAN N.J. - Biochem. Pharmacol., 1965, 14, p. 177.
- 195 - ROTHSTEIN - Bull. Soc. Chim., 1935, 2, p. 81.
- 196 - RUDEKNECHT H., WARD J.L., BERGEL F., MORRISON A.L. - Biochem. J., 1947, 41, p. 463.
- 197 - SANDBERG F. - Arzn. Forsch., 1959, 9, p. 203.
- 198 - SCHAFFER N.K. et coll. - J. Biol. Chem., 1953, 202, p. 69.
- 199 - SCHAFFER N.K. et coll. - J. Biol. Chem., 1954, 206, p. 201.
- 200 - SCHAFFER N.K. et coll. - Disc. Farad. Soc., 1955, 20, p. 134.
- 201 - SCHAFFER N.K. et coll. - Feder. Proc., 1955, 14, p. 275.
- 202 - SCHAUMANN O. - Arch. Exper. Pathol. Pharmacol., 1940, 196, p. 109.
- 203 - SCHAUMANN O. - Pharmazie, 1949, 4, p. 364.
- 204 - SCHENK G.O. - Ger., 1063 142, 1959.
- 205 - SCHENK G.O. - KOLTZENBURG G., GROSSMANN H. - Angew. Chem., 1957, 69, p. 177.
- 206 - SCHMIDT J., SUQUET M., SALLE J., COMOY P., CALLET G., LEMEUR J. - Chimie Thérapeutique, 1966, 5-6, p. 305.
- 207 - SCHOELLMANN G., SHAW E. - Biochemistry, 1963, 2, p. 252.
- 208 - SHAKHMAZARYAN G.M., SAAKYAN L.A., GARIBYAN V.A., DAVGYAN M.T. - Arm. Khim. Zer., 1966, 19, p. 815.
- 209 - SHIGEURA H.T. - Antibiotics, 1967, 1, p. 360.

- 210 - SKOU J. C. - The influence of some cations on an ATPase from peripheral nerve. Biochem. Biophys. Acta., 1957, 23, p. 394.
- 211 - SKOU J. C. - Further investigations on a $Mg^{+} + Na^{+}$ activated ATPase, possibility related to the active linked transport of Na^{+} and K^{+} across the nerve membrane. Biochim. Biophys. Acta., 1960, 42, p. 6.
- 212 - SKOU J. C. - Preparations from brain and kidney of the enzymes system involved in active transport of Na^{+} and K^{+} . Biochim. Biophys. Acta., 1962, 40, p. 327.
- 213 - SMITH S. C., DUNN F. W. - J. Med. Chem., 1969, 12, p. 701.
- 214 - SOLIMAN G., AHMED YOUSSEF H. A. - J. Chem. Soc., 1954, p. 4655.
- 215 - STACY G. W., CLEARY J., GORTATOWSKI M. J. - J. Am. Chem. Soc., 1957, 79, p. 1451.
- 216 - STEENSHOLT G. - Acta Physiol. Scand., 1943, 5, p. 71.
- 217 - STEWARD J. A., LEE H. S., DOBSON J. E. - J. Amer. Chem. Soc., 1963, 85, p. 1537.
- 218 - STOBBE H. - Ber., 1893, 26, p. 2312.
- 219 - STOBBE H. - Ber., 1904, 37, p. 2240.
- 220 - TAUBMAN M. A., ATASSI M. Z. - Biochem. J., 1968, 106, p. 829.
- 221 - THUILLIER G. et J. LAFOREST J., BESSIN P. - Recherches récentes dans le domaine des analgésiques, Chim. Ther., 1970, 5, p. 79.
- 222 - TOBIAS P., HEIDEMA J. H., LO K. W., KAISER E. T., KEZDY F. J. - J. Amer. Chem. Soc., 1969, 91, p. 202.
- 223 - TOSCHKOW A. - Antibiotiki, U. R. S. S., 1961, 6, p. 417.
- 224 - TRONCHE P. - Bull. Soc. Pharm. Marseille, 1967, 16, p. 153.
- 225 - TSCHESCHE R., BOHLE K., - Ber., 1936, 69, p. 443.
- 226 - TSEMLIN A. L., NIKONOV G. K., SHVAREV I. F., PIMENOV M. G. - Fed. Proc., 1966, 25, p. 1069.

- 227 - TURNER A.R. - Screening Methods in Pharmacology Academic Press. N. Y., 1965, 27, p. 27-34.
- 228 - TYLER W. P., BEESING D. W. - Anal. Chem., 1952, 24, p. 1511.
- 229 - U. S. Patent n° 3 203 857, 1965.
- 230 - U. S. Patent n° 3 431 258, 1967.
- 231 - U. S. Patent n° 3.436 390, 1967.
- 232 - U. S. Patent n° 3 484 457, 1969.
- 233 - VAHLEN E. - Arch. Exper. Pathol. Pharmacol., 1902, 47, p. 368.
- 234 - VANDER A. J., WILDE W. S., MALVIN R. L. - Stop flow analysis of aldosterone and steroidal antagonist S C 8109 on renal tubular sodium transport kinetics. Proc. Soc. Exp. Biol. N. Y., 1960, 103, p. 525.
- 235 - VAN DUREN, GOLDSMIDT B. L. - J. Med. Chem., 1966, 9, p. 77.
- 236 - WALKENSTEIN S. S., WISE R., GUMUNDSEN C., KIMMEL H. - Biochem. Biophys. Acta, 1964, 86, p. 640.
- 237 - WEATHERALL M. - Enzymes and drugs action, Ciba foundation symposium, J. et A. Churchill Ed., London, 1962, p. 117.
- 238 - WHITTMAN R., AGER M. E. - Dual Effects of sodium ions on an erythrocyte membrane ATPase. Biochim. Biophys. Acta., 1962, 65, p. 383.
- 239 - WILSON I. B. - The enzymes, Academic Press, New-York and London, 1960, 4, p. 501.
- 240 - WINTER C. A. - J. Pharmacol. Exp. Ther., 1948, 94, p. 7-11.
- 241 - WOOLFE G., Mac DONALD A. D. - J. of Pharmacol., 1944, 80, p. 300.
- 242 - WOLFF M. E., HO W. - J. Org. Chem., 1967, 32, p. 1839.
- 243 - WOLFF M. E., HO W., CHANG H. H. - J. Pharm. Sci., 1968, 57, p. 1450.
- 244 - WOLLEMAN M. - Agressologie, 1964, 5, p. 613.

- 245 - WOLLEMAN M. - Métabolisme des médiateurs chimiques du système nerveux, Masson Ed., Paris, Akademiai Kiado, Budapest, 1970.
- 246 - WOLLEMAN M., DEVENYI T. - Agressologie, 1963, 4, p. 593.
- 247 - WOLLEMAN M., DEVENYI T. - J. Neurochem., 1963, 10, p. 83.
- 248 - WOOTTON S. F., HESS G. P. - J. Amer. Chem. Soc., 1961, 82, p. 4234.
- 249 - ZAKHARKIN L. I. - Izvest. Akad. Nauk., U S S R, 1959, p. 2058.
-

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
<u>RECHERCHES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	3
- <u>Chapitre I :</u>	
Rappel sur la chimie des composés olidiques	5
- <u>Chapitre II :</u>	
Voies d'accès aux Spirolactones et aux Acides Lactone-carboxyliques	13
- <u>Chapitre III :</u>	
Les Lactones en Biologie	27
<u>RECHERCHES PERSONNELLES.</u>	45
ENZYMOLOGIE	49
- <u>Chapitre I :</u>	
Activité Chymotrypsique	53
- <u>Chapitre II :</u>	
Activité Trypsique	59
- <u>Chapitre III :</u>	
Activité Adénosine-Triphosphatasique Membranaire	63
PHARMACOLOGIE	69
<u>Chapitre I :</u>	
Détermination de la dose létale 50 du PC 343 a et du PC 360 par voie intra-pé ritonéale chez la souris	71
- <u>Chapitre II :</u>	
Etude des effets du PC 360 sur le compor- tement des animaux.....	75

- <u>Chapitre III :</u>	
Recherche d'une activité sédatrice par le test de la potentialisation du sommeil	83
- <u>Chapitre IV :</u>	
Recherche d'une activité antipeptique chez le cobaye	87
- <u>Chapitre V :</u>	
Recherche d'une activité anti-algique	91
- <u>Chapitre VI :</u>	
Recherche d'une activité anti-tussive	93
- <u>Chapitre VII :</u>	
Activité cholérétique	95
- <u>Chapitre VIII :</u>	
Recherche d'une activité cholagogue	107
- <u>Chapitre IX :</u>	
Recherche d'une activité diurétique	111
CONCLUSIONS GENERALES	113
BIBLIOGRAPHIE	115

